

Departement für Nutztiere, Klinik für Fortpflanzungsmedizin
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor a.i.: Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun

Einfluss von Verdünner und Zentrifugation auf die Qualität von Kühlen bei Isländer Hengsten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Konrad Sacher

Tierarzt
von Zuzgen/AG

genehmigt auf Antrag von

PD Dr. F. Janett, Referent
PD Dr. Colin Schwarzwald, Korreferent

Zürich 2011

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	3
3	EINLEITUNG	4
3.1	DAS ISLANDPFERD	4
3.1.1	Gangarten	4
3.1.2	Haltung und Fruchtbarkeit	6
3.1.3	Künstliche Besamung	7
3.2	KONSERVIERUNG VON HENGSTSAMEN	7
3.2.1	Frischsamen	7
3.2.2	Kühlsamen	8
3.2.3	Gefriersamen	10
3.3	FRAGESTELLUNG	11
4	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	12
4.1	TIERE	12
4.2	SAMENGEWINNUNG	12
4.3	UNTERSUCHUNGEN IM FRISCHSAMEN	12
4.4	SAMENVERARBEITUNG	14
4.4.1	Samenverdünnung	14
4.4.2	Zentrifugation	15
4.4.3	Samenlagerung	15
4.5	UNTERSUCHUNGEN IM KONSERVIERTEN SAMEN	15
4.5.1	Motilität	16
4.5.2	Vitalität	16
4.5.3	HOS Test	17
4.6	VERSUCHSANORDNUNG	18
4.7	STATISTIK	19

5	ERGEBNISSE	20
5.1	QUALITÄT DES FRISCHSAMENS	20
5.1.1	Ejakulatvolumen	20
5.1.2	Spermienkonzentration	21
5.1.3	Gesamtspermienzahl	22
5.1.4	Totale Motilität	23
5.1.5	Progressive Motilität	23
5.1.6	Rapide Motilität	24
5.2	QUALITÄT DES KONSERVIERTEN SAMENS	25
5.2.1	Totale Motilität	26
5.2.2	Progressive Motilität	29
5.2.3	Rapide Motilität	31
5.2.4	Vitalität	33
5.2.5	HOS Test	36
6	DISKUSSION	40
7	LITERATUR	44
8	DANK	51

1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Qualität von Frisch- und Kühlsamen beim Isländer Hengst näher zu untersuchen. Für die Studie standen 7 Hengste im Alter von 3 bis 19 Jahren zur Verfügung. Von jedem Hengst wurden 6 Ejakulate gewonnen und darin Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl sowie Spermienmotilität (CASA) bestimmt. Die Ejakulate wurden in 8 gleiche Fraktionen aufgeteilt, mit vier verschiedenen Verdünnern, INRA 82-Eigelb, INRA 96TM, GENTTM sowie Equi-ProTM versehen und anschliessend jeweils mit und ohne Zentrifugation (10 min, 600xg) während 24 Std. im EquitainerTM gekühlt und während weiteren 24 Std. bei 4°C gelagert. Unmittelbar nach der Verdünnung sowie nach 24 und 48 Std. Lagerung erfolgte die Bestimmung der Motilität (CASA), Vitalität (SYBR-14/PI Färbung) und der HOS-positiven Spermien. Die Ergebnisse zeigen, dass der Hengst einen signifikanten Einfluss auf alle Parameter im Frischsamen hatte und die Durchschnittswerte für Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl und Spermienmotilität jeweils 43.4 ml, 193.0 Millionen/ml, 6.7 Milliarden bzw. 73.5% betrugen. Im Kühlsamen konnte bei allen Parametern ein signifikanter ($P < 0.05$) Einfluss von Lagerungszeit und Verdünner sowie mit Ausnahme der rapiden Motilität eine signifikante Interaktion von Verdünner und Zentrifugation festgestellt werden. Ausser Equi-ProTM eigneten sich alle getesteten Verdüner gut für die Kühlsamenkonservierung, wobei für eine Lagerungszeit von mehr als 24 Std. die Entfernung des Seminalplasmas von Vorteil war.

2 Summary

Effect of extender and centrifugation on the quality of cold-stored semen in Icelandic stallions

The objective of this study was to evaluate the quality of fresh and cooled semen in Icelandic horses. Experiments were performed using 7 Icelandic stallions aged between 3 and 19 years. From each stallion 6 ejaculates were collected and volume, concentration, total sperm count and sperm motility determined. Thereafter, the semen was split into 8 equal parts and processed with and without centrifugation (10 min, 600xg) using the extenders INRA 82-egg yolk, INRA 96TM, GENTTM as well as Equi-ProTM, packaged and cooled in an EquitainerTM for 24 h and stored for another 24 h at 4 °C. Immediately after dilution as well as after 24 and 48 h storage, sperm motility (CASA), sperm viability (SYBR-14/PI staining) and HOS-positive sperm were determined. The results show that the stallion had a significant influence on all parameters in fresh semen and mean values of 43.4 ml for the volume, 193.0 millions/ml for the concentration, 6.7 billions for total sperm and 73.5% for sperm motility were measured. In the cold-stored semen, all parameters were significantly ($P < 0.05$) influenced by storage time as well as extender and besides rapid motility also by the interaction between extender and centrifugation. Except Equi-ProTM, all examined extenders were suitable for cooled semen preservation, but for storage of more than 24 h, centrifugation and removal of the seminal plasma was an advantage.

3 Einleitung

3.1 Das Islandpferd

Das Islandpferd stammt von skandinavischen Pferden ab, welche in den Jahren 874-940 n. Chr. von norwegischen Wikingern nach Island gebracht wurden (Steinbjörnsson und Kristjansson, 1999). Seitdem erfolgte die Zucht weitgehend ohne äussere Einflüsse und ab dem 17.3.1882 wurde der Import von Vieh, namentlich Pferden, Rindern und Schafen per Gesetz „Lög um bann gegn innflutningi á útlendu kvikfje“ verboten. Die Reinzucht über Jahrhunderte und die rauen klimatischen Bedingungen prägten diese robuste Kleinpferderasse mit einer Widerristhöhe von 132 ± 5 cm und einem Körpergewicht von 365 ± 20 kg (Isenbügel, 1966). Im Jahr 1904 wurde die erste isländische Pferdezuchtorganisation (Hugason, 1994) und 1969 die „Föderation Europäischer Islandpferde Freunde“ (FEIF) von Gunnar Bjarnason (IS), Gunnar Jonsson (DK), Walter Feldmann (DE) sowie Max Indermaur (CH) und Ewald Isenbügel (CH) als ersten Präsidenten, gegründet. Die Abkürzung FEIF wurde beibehalten, und heute besteht die „International Federation of Icelandic Horse Associations“ aus 19 Mitgliedsländern (Belgien, Dänemark, Deutschland, Färöer Inseln, Finnland, Frankreich, Grossbritannien, Island, Italien, Kanada, Luxemburg, Neuseeland, Niederlande, Norwegen, Österreich, Slowenien, Schweden, Schweiz, USA). Weltweit gibt es mehr als 238'000 Islandpferde, davon werden 78'000 in Island und 65'000 in Deutschland gehalten (FEFI, 2009).

3.1.1 Gangarten

Das Islandpferd verfügt, je nach Veranlagung, neben den bekannten drei Gangarten, Schritt, Trab und Galopp, über zwei weitere Gänge den Tölt und den Pass. Der Tölt (Abb. 1) ist die Gangart, die das Islandpferd populär gemacht hat. Das Bild vom Islandpferd ist unmittelbar verknüpft mit der Vorstellung vom flott vorwärts töltenden Pferd mit wehender Mähne. Tölt kann vom Arbeitstempo (Schritttempo) bis zum Renntempo (Galopp tempo) geritten werden. Nicht jeder Tölter beherrscht den ganzen Geschwindigkeitsbereich der sich aber durch Training nach unten wie nach oben ausweiten lässt.



Abbildung 1: Islandpferd im schnellen Tölt (Quelle: Islandpferde-Vereinigung Schweiz, <http://www.ipvch.ch>).

Der Tölt ist, wie der Schritt, ein reiner Viertakt mit acht Phasen. Der Unterschied zum Schritt liegt im Tempo. Tölt ist eine gelaufene Gangart und keine schreitende. Dadurch wird die Dreibeinstütze des Schrittes im Tölt zur Einbeinstütze. Der Tölt ist sehr bequem zu sitzen, weil keine Schwebephase vorhanden ist. Es gibt keine groben Erschütterungen für den Reiter, da immer mindestens ein Bein am Boden bleibt. Beim reinen Viertakttölt ist lediglich eine leichte Rotationsbewegung im Sattel zu spüren.

Der Pass (Abb. 2) ist beim Islandpferd nur im Renntempo gefragt. Er muss eine eindeutige Schwebephase aufweisen, d.h. eine Phase in der kein Bein den Boden berührt. Beim Rennpass handelt es sich um einen Viertakt mit acht Phasen, wobei das Pferd nahe an den Zweitakt heran kommt. Acht Phasen entstehen dadurch, dass die Hinterbeine beim Rennpass ganz kurz vor den Vorderbeinen aufsetzen. Die Beine der lateralen Zweibeinstütze werden also nicht genau gleichzeitig aufgesetzt. In der Schrittfolge sind sich der Rennpass

und der Tölt sehr ähnlich, nur verschiebt sich der Takt im Rennpass mehr zum Zweitakt hin, die diagonale Zweibeinstütze fällt weg und wird durch die Schwebephase ersetzt.



Abbildung 2: Islandpferd im Rennpass (Quelle: Islandpferde-Vereinigung Schweiz, <http://www.ipvch.ch>).

3.1.2 Haltung und Fruchtbarkeit

In Island werden die Pferde in der Regel extensiv gehalten. Vereinzelt erfolgt die Haltung während des Trainings im Winter im Stall und sehr gefragte Hengste decken zu Beginn der Zuchtsaison an der Hand (Morel und Gunnarsson, 2000). Die Zuchtsaison dauert von Mai bis September und die meisten Stuten werden im Mai bis Juli gedeckt (Dyrmundsson, 1994). Die Fertilität bei Natursprung in der Herde ist sehr gut. Hugason et al. (1985) berichteten über eine Abfohlrate von 82.1%. Ein wichtiger Faktor für die Fruchtbarkeit ist die Grösse der Herde (Steinbjörnsson und Kristjansson, 1999). Bei Herden mit nur 12 Stuten wurde eine Abfohlrate von 82% erreicht, während bei Herden mit 16–20 Stuten mit 76% deutlich weniger Stuten abfohlten. Morel und Gunnarsson (2000) werteten die Fruchtbarkeit von 27

Hengsten, die insgesamt 1590 Stuten belegt hatten aus und berechneten eine korrigierte Abfohlrate von 67.7%. Dabei wiesen die Hengste eine grosse Variabilität von 41.4% bis 88.0% auf, wobei der Trainingszustand des Hengstes, die Zuchtmethode, das Alter der Stute und die Interaktion von Hengst und Reproduktionsstatus der Stute signifikante Auswirkungen auf die Abfohlrate hatten.

3.1.3 Künstliche Besamung

Während die künstliche Besamung (KB) in der Pferdezucht bei vielen Rassen mittlerweile breit angewendet wird, erfolgt die Belegung beim Islandpferd nach wie vor hauptsächlich im Natursprung in der Herde. Der Grund dafür liegt wohl in der Philosophie der Züchter, die ihre Pferde möglichst natürlich halten wollen. Ausserdem stellt die KB eine grosse Konkurrenz für den Absatz der Hengste im Export dar und macht zusätzliche finanzielle Aufwendungen nötig. Über den Einsatz der KB beim Islandpferd fehlen entsprechende Angaben in der Literatur. Eine Besamungsstation wurde zwar in Holar eingerichtet hat jedoch mittlerweile den Betrieb wieder eingestellt. Gemäss Angaben verschiedener Islandpferdevereinigungen und von Züchtern wird die KB beim Isländer in Europa, Amerika und Canada nur in geringem Umfang angewendet. Dabei wird vor allem Frisch- oder Kühltaschen und nur selten Gefriersperma eingesetzt und über den Erfolg liegen keine verlässlichen Angaben vor.

3.2 Konservierung von Hengstsamen

Grundsätzlich wird Hengstsperma als Frisch-, Kühl- oder als Gefriersamen für die KB verwendet (Samper, 2000).

3.2.1 Frischsamen

Im unverdünnten Ejakulat können die Spermien aufgrund der Ansammlung toxischer Stoffwechsel- und Autolyseprodukte nur kurzfristig überleben. Unverdünnter Frischsamen muss daher unmittelbar nach der Samengewinnung auf die Stute übertragen werden (Katila, 1997; Samper, 2000). Bei Stuten, die zu Endometritis neigen wird der Frischsamen in der Regel verdünnt, bei Zimmertemperatur gelagert und innerhalb von 6 Stunden nach der Gewinnung übertragen. Die geringere Spermienkonzentration im verdünnten Samen

verursacht eine schwächere Entzündungsreaktion im Uterus als hohe Spermienkonzentrationen (Kotilainen et al., 1994).

3.2.2 Kühlsamen

Für die Lagerung muss der Samen sofort nach der Gewinnung mit einem geeigneten Medium verdünnt und gekühlt werden. Samenverdünner müssen eine ähnliche Osmolarität wie das Ejakulat aufweisen, pH neutral und gepuffert sein, Nährstoffe, membranstabilisierende sowie antibakterielle Substanzen enthalten (Katila, 1997). Hengstsamen hat eine Osmolarität von ungefähr 300 mOsm/L und die Osmolarität von bewährten Verdünnern liegt zwischen 250-350 mOsm/L. Der pH Wert von Hengstsamen beträgt 7.4-7.6 und ist abhängig von der Spermiedichte und vom Anteil an alkalischem Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Die meisten Hengstsamenverdünner haben einen pH Wert von 6.5-7.0. Zur Neutralisierung von Stoffwechselprodukten werden dem Verdünner wasserlösliche Substanzen wie Natriumbikarbonat (pH-Optimum 6.8–7.2) oder sogenannte Zwitterionenpuffer wie HEPES (Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure) zugesetzt. Als Nährsubstrat zur Gewinnung von ATP enthalten die Verdünner Zucker wie Glucose, Fructose, Lactose, Raffinose, Saccharose oder Pyruvat. Zum Schutz der Membranen vor Temperaturschwankungen werden dem Verdünner verschiedene Substanzen wie Eigelb, Milchbestandteile, Serum Albumin, Polyvinylalkohol und Liposomen beigegeben. Eigelb ist wegen der membranprotektiven Eigenschaften von Lecithin (Quinn et al., 1980) und Lipoproteinen (Watson, 1981) ein wichtiger Bestandteil vieler Samenverdünner (Watson, 1976; Holt, 2000). Lecithin (Phosphatidylcholin) lagert sich aufgrund der negativen Ladung an die Zellmembranproteine an und stabilisiert diese bei Temperaturschwankungen (Amann und Pickett, 1987). Auch Milch enthält Lipoproteine und Phospholipide, welche die Spermienmembranen stabilisieren und zusätzlich eine Pufferkapazität gegenüber Stoffwechselprodukten aufweisen (Pickett und Amann, 1987). Für die protektive Wirkung auf die Spermien ist der Milchfettanteil nicht ausschlaggebend, denn mit Magermilch verdünnter Samen weist im Vergleich zu Medien mit hohem Milchfettanteil, eine bessere Fruchtbarkeit auf (Householder et al., 1981). Heute werden weltweit Hengstsamenverdünner auf der Basis von Magermilch, wie der Kenney's extender (Kenney, 1975), EZ MixinTM (Animal Reproduction Systems, Chino, CA, USA) oder INRA 82 (Palmer,

1994), mit gutem Erfolg verwendet. Das Problem von Eigelb und Milchbestandteilen ist die inkonstante Zusammensetzung der Inhaltsstoffe. Diese Produkte können zudem mit Mikroorganismen verunreinigt sein sowie hormonell aktive Steroide und toxische Substanzen enthalten. Batellier et al. (1997) identifizierten natives Phosphocaseinat und β -Laktoglobulin als protektive und α -Laktalbumin als schädliche Milchbestandteile für das Überleben von Hengstspermien. Aufgrund der Erkenntnisse, dass natives Phosphocaseinat unter aeroben Bedingungen bei 15°C im Vergleich zu Milchverdünnern bei 5°C die besten protektiven Eigenschaften aufwies, erfolgte die Entwicklung von INRA96 (IMV Technologies, Saint Ouen Sur Iton, Frankreich), einem kommerziell erhältlichen Verdünner mit chemisch definierter Zusammensetzung (Batellier et al., 1997, 1998; 2001).

Einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität und Fruchtbarkeit von gelagertem Samen hat der Anteil an Seminalplasma. Hohe (>20%) und niedrige (<5%) Konzentrationen an Seminalplasma beeinträchtigen die Spermienmotilität, wenn der verdünnte Samen während längerer Zeit gekühlt aufbewahrt wird (Pickett et al., 1975a; Jasko et al., 1991a; Pruitt et al., 1993). Die beste Qualität des gelagerten Samens wird bei einem Anteil von 10% Seminalplasma erreicht (Pickett et al., 1975a; Palmer, 1984; Jasko et al., 1992). Eine Reduktion des Anteils an Seminalplasma kann durch Verdünnung, Zentrifugation und durch fraktioniertes Auffangen des Ejakulates erreicht werden. Für eine optimale Aufrechterhaltung der Motilität muss der Samen jedoch mindestens in einem Verhältnis von 1:2 auf eine Konzentration von 25 Millionen Spermien pro ml verdünnt werden (Varner et al., 1987; Webb et al., 1993).

Entscheidend für das Überleben der Samenzellen während der Lagerung ist die Kühlung, damit der Spermienstoffwechsel gedrosselt, die Keimvermehrung gehemmt und die Vitalität der Spermien erhalten bleibt. Bei einer Lagerung des verdünnten Samens während 24 Std. konnten bei Temperaturen von 20°C (Province et al., 1985; Franel et al., 1987; Varner et al., 1988, 1989), 15°C (Batellier et al., 1998) und 5°C (Varner et al., 1988, 1989; Batellier et al., 2001) durchwegs gute Ergebnisse erzielt werden. Bei einer Lagerungsdauer von mehr als 24 Std. überleben die Spermien jedoch am besten unter anaeroben Bedingungen bei Temperaturen von 4-6°C (Squires et al., 1988; Zidane et al., 1991; Moran et al., 1992; Batellier et al., 2001). Zur Vermeidung eines Kälteschocks muss das Abkühlen des Samens langsam erfolgen, damit Plasma- und Akrosommembranen sowie Enzyme nicht geschädigt

werden. Für Hengstsamen haben sich Abkühlraten von $<0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bewährt, wobei im kritischen Bereich von 19°C bis 8°C eine langsamere Abkühlung ($<0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) empfohlen wird. Hingegen haben eine rasche Abkühlung von 37°C auf 19°C sowie von 8°C auf 4°C keine negativen Auswirkungen auf Samenqualität und Fruchtbarkeit (Moran et al., 1992). Ein bewährtes System für die Kühlung und den Transport von Pferdesamen ist der EquitainerTM (Hamilton Research, Inc. South Hamilton, MA, USA). Der Samen wird unmittelbar nach der Verdünnung bei Zimmertemperatur in den EquitainerTM gepackt und mit einer Rate von $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf eine Endtemperatur von $4-6^{\circ}\text{C}$ abgekühlt (Douglas-Hamilton et al., 1984). Diese Temperatur wird im EquitainerTM selbst bei hohen und tiefen Umgebungstemperaturen während mindestens 36 Std. aufrechterhalten (Malmgreen, 1998; Brinsko et al., 2000).

Nicht alle Hengste eignen sich gleich gut für die Kühltaschenproduktion. Bei manchen Hengsten nimmt die Samenqualität bei Kühlung auf 5°C so stark ab, dass der Samen nicht mehr für die KB verwendet werden kann. Aufgrund der individuellen Empfindlichkeit der Spermien auf Abkühlung können Hengste in „good coolers“ und „poor coolers“ eingeteilt werden (Brinsko, et al., 2000; Batellier, et al., 2001). Verdünnter Samen von „poor coolers“ sollte, um Schädigungen zu vermeiden, nicht unter 15° gekühlt und innerhalb von 24 Std. verwendet werden (Batellier et al., 2001). Was die Fruchtbarkeit anbelangt wurden mit Kühltaschen gleich gute Ergebnisse wie mit Frischsamen oder im Natursprung erzielt (Douglas-Hamilton et al., 1984; Varner et al., 1989; Loomis, 1992).

3.2.3 Gefriersamen

Die Kryokonservierung von Hengstsamen wird in der Regel in einem two-step-Verfahren vorgenommen. Zuerst wird der frische Samen verdünnt und zentrifugiert. Anschliessend, in einem zweiten Schritt, erfolgen die Zugabe eines Verdünners mit Kryoprotektiva (Glycerin, Eigelb) und das Tiefgefrieren. Im ersten Schritt wird unter Verwendung der gleichen Verdünner wie beim Kühltaschen (Verhältnis mindestens 1:2) eine Konzentration von ≈ 50 Millionen Spermien/ml erreicht. Durch Zentrifugation wird der Samen konzentriert und ein Teil des für den Kühl- und Gefrierprozess schädlichen Seminalplasmas (Pickett et al., 1975a; Palmer, 1984; Jasko et al., 1992; Moor et al., 2005) entfernt. Die verschiedenen Zentrifugationsmethoden (Samper und Morris, 1998; Sieme et al., 2008) unterscheiden sich hinsichtlich Dauer (6-20 min) und Zentrifugation ($350-1000\times g$). Bei der Zentrifugation

können irreversible Membranschädigungen durch sogenannte „reactive oxigen species“ (ROS) auftreten (Aiken et al., 1989). Dabei soll die Zentrifugationsdauer eine grössere Rolle spielen als die verwendete G-Kraft (Shekarriz et al., 1995). Ausserdem muss je nach Methode ein Spermienverlust von bis zu 25% in Kauf genommen werden (Weiss et al., 2004). Als schonende Methode mit geringem Spermienverlust hat sich die Zentrifugation bei 600xg während 10 min bei Zimmertemperatur bewährt (Weiss et al., 2004; Vidament et al., 2005). Nach der Zentrifugation werden ca. 90% des Überstandes entfernt (Amman und Pickett, 1987; Weiss et al., 2004) und das Pellet in Gefrierverdünnern auf eine Spermienkonzentration von 100-400 Millionen Spermien/ml resuspendiert. Gefrierverdünnern werden auf der Basis von Milch oder Lactose-EDTA mit 2.5-6% Glycerin als Kryoprotektivum und 2-20% Eigelb hergestellt (Samper und Morris, 1998; Vidament et al., 2005; Sieme et al., 2008). Nach der Endverdünnung wird der Samen langsam von Raumtemperatur auf 4°C gekühlt, während 1-2 Std. aequilibriert, dann in Pailletten abgepackt und im Stickstoffdampf oder in einem programmierbaren Einfriergerät (-60°C/min bis -140°C) tiefgefroren (Vidament et al., 2001, Weiss et al., 2004).

Als Nachteil von Gefriersamen im Vergleich zu Frisch- oder Kühlsamen müssen der höhere Arbeitsaufwand für die Produktion sowie eine geringere Trächtigkeitsrate in Kauf genommen werden. Aufgrund der Temperaturschwankungen beim Einfrieren und Auftauen des Samens entstehen osmotische Veränderungen sowie intra- und extrazelluläre Kristallisationsvorgänge (Bailey et al., 2000; Holt et al., 2000; Watson, 2000; Sieme et al., 2008). Diese führen zu Membranschädigungen und beeinträchtigen die Vitalität und Befruchtungsfähigkeit der Spermien. 20% der Hengste eignen sich gut („good freezers“), 60% mässig und 20% schlecht („poor freezers“) für die Produktion von Gefriersamen (Vidament et al., 1997).

3.3 Fragestellung

Da eingehende Untersuchungen zur Qualität und Konservierung von Samen beim Isländer fehlen, bestand das Ziel der vorliegenden Studie darin, die Frischsamenqualität sowie den Einfluss von 4 verschiedenen Verdünnern mit und ohne Entfernung des Seminalplasmas auf die Qualität von Kühlsamen bei Isländer Hengsten näher abzuklären.

4 Tiere, Material und Methoden

4.1 Tiere

Für die vorliegenden Untersuchungen standen 7 klinisch gesunde Isländer Hengste im Alter von 3 bis 19 Jahren zur Verfügung. Die Tiere wurden am Alten Strickhof des Tierspitals Zürich in Einzelboxen auf Stroh gehalten und täglich im Auslauf oder auf der Weide bewegt. Die Fütterung bestand aus Heu, Gras sowie Pellets und zusätzlich zweimal pro Woche Mash (aufgebrühter Hafer, Weizenkleie, Leinsamen, Glaubersalz).

4.2 Samengewinnung

Von April bis Oktober 2004 und 2005 wurden von jedem Hengst insgesamt 6 Ejakulate an 3 aufeinanderfolgenden Wochen gewonnen, untersucht und verarbeitet. Die Samengewinnung erfolgte 2-mal wöchentlich jeweils am Montag und am Mittwoch in Anwesenheit einer Stute mittels einer künstlichen Scheide Modell „Hannover“ (Minitüb, Landshut, Deutschland). Dafür wurden die Hengste ans Phantom (Dummy Mare, ArnoldsTM, Shrewsbury, Grossbritannien) gewöhnt oder falls dies nicht möglich war, auf einer ausgebundenen Stute abgesamt.

4.3 Untersuchungen im Frischsamen

Unmittelbar nach der Samengewinnung wurde das Ejakulat filtriert (Eimermacher Milchfilter-Schlauch 250 x 57 mm, Westfalia AG, Koppigen, Schweiz), das Volumen in einem graduieren Gefäss bestimmt und der Samen für die Verarbeitung auf eine Wärmeplatte (37°C) gestellt. Anschliessend erfolgte die Bestimmung der Spermiedichte mittels computerassistierter Spermienanalyse (CASA) (Hamilton Thorne IVOS, Version 14, Beverly, MA, USA) unter Verwendung der Analyseinstellungen für Hengstsamen (Tab. 1). Dazu wurden 10 µl frischer Samen mit 20 µl INRA 96TM (IMV Technologies, Saint Ouen Sur Iton, Frankreich) Medium vermischt und davon 5 µl in eine standardisierte Kammer von 20 Micrometer Tiefe (standard count analysis chambers, Art. no. SC 20-01-C, Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) gegeben und mindestens 10 Felder mit dem CASA beurteilt.

Tabelle 1: Analyse-Einstellungen CASA für Hengstsamen.

Parameter	Einstellung
Frames aquired	30
Frame rate	60 Hz
Minimum contrast	115
Minimum cell size	2 pix
Minimum static contrast	15
Straightness (STR), threshold	50 %
VAP cutoff	5.0 $\mu\text{m/s}$
Prog. min. VAP	50.0 $\mu\text{m/s}$
VSL cutoff	15.0 $\mu\text{m/s}$
Cell size	6 pix
Cell intensity	125
Static head size	0.70 to 3.60
Static head intensity	0.25 to 2.10
Static elongation	0 to 100
Slow cells motile	NO
Magnification	1.89
Video frequency	60
Bright field	NO
LED illumination intensity	2280
IDENT Illumination intensity	3000
Temperature, set	37.5 °C
Chamber depth	20 μm
Chamber position	4.0 mm
Chamber position B	19.0 mm
Chamber position C	0 mm
Chamber position D	0 mm
Chamber type	Slide20
Field selection mode	AUTO
IDENT fluorescent option	OFF
Integrating time	1 frame

4.4 Samenverarbeitung

4.4.1 Samenverdünnung

Die Verdünnung des Samens erfolgte mit den bewährten Hengstsamenverdünnern, INRA 82-Eigelb, INRA 96TM, GENTTM und Equi-ProTM.

INRA 82-Eigelb besteht aus gleichen Teilen Elektrolytlösung und Magermilch sowie 2% Eigelb und wurde nach der folgenden Rezeptur (Palmer, 1984) hergestellt:

Herstellung der Elektrolytlösung

Glukose wasserfrei ($C_6H_{12}O_6$)	50.00 g
Laktose-Monohydrat ($C_{12}H_{22}O_{11}$, H_2O)	3.00 g
Raffinose-Pentahydrat ($C_{18}H_{32}O_{16}$, $5H_2O$)	3.00 g
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7$, $2H_2O$)	0.49 g
Tri-Kaliumcitrat-Monohydrat ($C_6H_5K_3O_7$, H_2O)	0.82 g
Hepes: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2Ethansulfonsäure ($C_8H_{18}N_2O_4S$)	9.52 g

ad 1 Liter Aqua ad injectabilia

1 L Elektrolytlösung und 1 L Magermilch UHT zusammengeben und gut mischen

Herstellung und Zugabe der Eidotterlösung

40 ml Elektrolyt/Magermilchlösung mit 50 ml Eigelb (frische Eier) im Rührer während mindestens 10 Minuten gut mischen und anschliessend zentrifugieren (600 x g, 10 min). 80 ml des Überstandes zu 1920 ml Elektrolyt/Magermilchlösung geben, mischen und pH kontrollieren (pH = 6.8).

INRA 96TM ist patentrechtlich geschützt und als gebrauchsfertige Lösung erhältlich (Art. Nr. 016441, IMV Technologie, Saint Ouen Sur Iton, Frankreich). Dieser Verdünner enthält Hank's Salze, Glucose, Lactose sowie natives Phosphocaseinat (Batellier et al., 1998).

GENTTM-Verdünner wurde an der Universität Gent (Belgien) entwickelt und setzt sich aus Puffersubstanzen, Milch und Eigelb zusammen. Der Verdünner wird von der Firma Minitüb vermarktet (Art. Nr. 13571/0045, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland).

Equi-ProTM ist gemäss Angaben des Herstellers eine verbesserte Formulierung des Kenney's Verdünners (Kenney et al., 1975). Equi-ProTM (Art. Nr. 13570/0210, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) enthält fettloses Milchpulver, hochwertige Zucker, Puffersubstanzen sowie Antibiotika und muss vor der Verwendung in Aqua ad injectionem aufgelöst werden.

Für die Verarbeitung wurde das frisch gewonnen Ejakulat in 4 gleiche Teile aufgeteilt und in 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschliessend wurde je ein Aliquot Samen im Wärmebad bei 37°C mit INRA 82-Eigelb, INRA 96TM, GENTTM sowie Equi-ProTM auf eine Konzentration von 30 Millionen Spermien/ml, jedoch mindesten im Verhältnis 1:2, verdünnt. Mengen von 10 ml des verdünnten Samens wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen abgefüllt und bis zur Weiterverarbeitung bei Zimmertemperatur gelagert.

4.4.2 Zentrifugation

Von jeder Samenverdünnung wurde bei Raumtemperatur ein Zentrifugenröhrchen während 10 Minuten bei 600 x g zentrifugiert (Vidament et al., 2001; Weiss et al., 2004). Anschliessend wurden 90% des Überstandes abpipettiert und das Pellet wieder mit dem entsprechenden Verdünner auf eine Dichte von 30 Millionen Spermien/ml resuspendiert.

4.4.3 Samenlagerung

Unmittelbar nach der Zentrifugation (Zeitpunkt 0) wurde von jeder Samenverdünnung, jeweils ein nicht zentrifugiertes sowie ein zentrifugiertes Röhrchen in einen EquitainerTM (Hamilton Thorne Beverly, MA, USA) gepackt. Nach 24 Std. erfolgte das Umpacken der Röhrchen vom EquitainerTM in den Kühlraum wo der Samen für weitere 24 Std. bei 4°C gelagert wurde.

4.5 Untersuchungen im konservierten Samen

Die Beurteilung der Motilität und Vitalität des konservierten Samens erfolgte unmittelbar nach der Verdünnung, nach 24 Std. Lagerung im EquitainerTM sowie nach weiteren 24 Std. Lagerung im Kühlraum.

4.5.1 Motilität

Die Bestimmung der Motilität erfolgte mittels computerassistierter Spermienanalyse (CASA, Hamilton Thorne IVOS, Version 14, Beverly, MA, USA) und den Analyseeinstellungen für Hengstsamen (Tab. 1). Für die Messung wurden je 5 µl der Samenprobe in eine standardisierte Kammer von 20 Micrometer Tiefe (standard count analysis chambers, Art. no. SC 20-01-C, Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) gegeben und mindestens 10 Felder mit insgesamt mehr als 500 Spermien beurteilt. Für die Auswertung wurden der Prozentsatz an total (total motility), progressiv (progressive motility) und rapid (rapid cells, velocity average path VAP > 50 µm/s) motilen Spermien berücksichtigt.

4.5.2 Vitalität

Zur Bestimmung der strukturellen Membranintegrität wurde eine DNA-Doppelfärbung durchgeführt (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, Molecular Probes Europe, Leiden, NL). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-14 durchdringt die Zellmembran und bindet an die DNA lebender und toter Zellen. Der zweite Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) kann die Plasmamembran lebender Zellen nicht penetrieren und färbt daher nur tote Zellen an (Garner et al., 1994). Durch die Kombination beider Farbstoffe lassen sich tote (PI) von lebenden Spermien (SYBR-14) unterscheiden.

SYBR-14 wurde mit DMSO (100%) in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt, während Propidiumjodid in der von der Firma gelieferten Form verwendet wurde. Zwei µl der SYBR-14/DMSO-Lösung wurden zu 1 ml verdünntem Samen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C wurden 5 µl PI dazugegeben und während weiteren 5 Minuten inkubiert. Danach wurden zweimal je 5 µl des gefärbten Samens auf einen Objektträger pipettiert, mit Deckgläser 24 x 24 mm versehen und bei 400facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Olympus BX50, U Plan Apo 40x/0.85 mit Fluoreszenzeinrichtung, Filtermodul FITC, Hochdruck-Hg-Lampe) untersucht. Bei einer Anregung durch sichtbares Licht (480 nm) liegen die maximalen Fluoreszenzemissionen für die Farbstoffe SYBR-14 (grün) und PI (orange) bei Wellenlängen von 516 nm bzw. 617 nm. Über eine am Mikroskop angeschlossene Videokamera (Color CCD Camera, SANYO VCC-2972) konnten Bildsequenzen mit dem Programm Windows Media Player (<http://www.microsoft.com>) auf einen Computer

gespeichert und ausgewertet werden. Der prozentuale Anteil an grün fluoreszierenden Spermien wurde der Vitalität gleichgesetzt.

4.5.3 HOS Test

Zur Ermittlung der funktionellen Membranintegrität wurde der hypoosmotische Schwelltest (HOS) durchgeführt. Intakte Membranen erlauben den Austausch von Ionen und Flüssigkeit zwischen dem intra- und extrazellulären Raum. Werden Samenzellen in ein hypotones Milieu gegeben, schwellen sie bei intakter Membran aufgrund des Flüssigkeitseinstromes zur Erhaltung des osmotischen Gleichgewichtes an. Die Schwellung der Spermien ist durch typische morphologische Veränderungen des Spermischwanzes (Aufrollen und Schlingenbildung) erkennbar.

Zur Durchführung des Tests wurden 100 µl des konservierten Samens zu 1 ml vorgewärmter (37°C) HOS-Lösung (Fructose 9.0 g, Trisodium Citrat 4.9 g, Aqua bidestillata ad 1'000 ml, Osmolarität 100 mOsm/l) gegeben und während 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zwei Tropfen Samenlösung à je 5 µl wurden auf einen Objektträger gegeben, mit Deckgläser 24 x 24 mm versehen und bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrast untersucht. Nach Beurteilung von mindestens 200 Spermien wurde aufgrund der morphologischen Veränderungen des Spermischwanzes der prozentuale Anteil geschwollener (HOS positiv) Spermien bestimmt (Jeyendran et al., 1984; Neild et al., 1999).

4.6 Versuchsanordnung

Die Versuchsanordnung der Studie ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

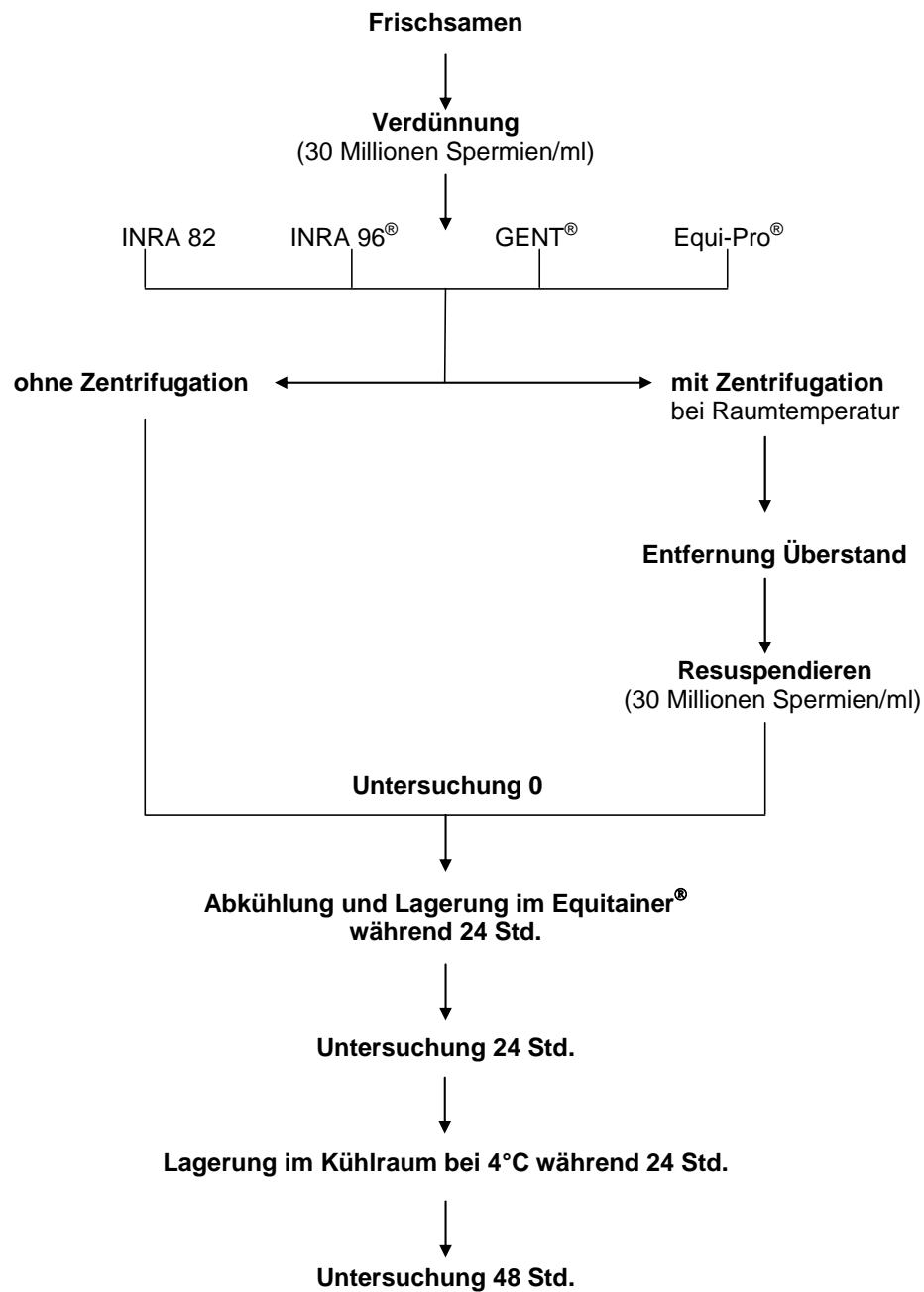


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung.

4.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 13 (SPSS Inc., IBM Company Headquarters, Chicago, Illinois 60606, USA). Der Einfluss von Hengst und Ejakulat auf die Parameter im Frischsamen wurde mittels ANOVA untersucht. Bei den im Kùhlsamen bestimmten Parametern wurden mit Hilfe eines linearen Modells die Einflüsse von Ejakulat, Zentrifugation, Verdünnung und Lagerungszeit sowie die Interaktionen zwischen den einzelnen Faktoren geprüft. Post-hoc-Vergleiche erfolgten nach Bonferroni/Dunn Korrektur. Die Signifikanzschwelle wurde bei $P < 0.05$ festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Qualität des Frischsamens

Die Ergebnisse zur Überprüfung des Einflusses von Hengst und Ejakulat auf die Qualitätsparameter im Frischsamen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Daraus ist ersichtlich, dass der Hengst, nicht aber das Ejakulat auf alle untersuchten Parameter einen signifikanten ($P < 0.05$) Einfluss hatte.

Tabelle 2: Einfluss von Hengst und Ejakulat auf die verschiedenen Parameter im Frischsamen.

Parameter	Volumen P	Spermien- konzentration P	Gesamt- spermienzahl P	Totale Motilität P	Progressive Motilität P	Rapide Motilität P
Hengst	<0.0001*	<0.0001*	0.0015*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*
Ejakulat	0.7250	0.5573	0.7936	0.4280	0.1721	0.5180

*signifikant ($P < 0.05$)

5.1.1 Ejakulatvolumen

Das durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) Ejakulatvolumen der 7 Hengste betrug 43.4 ± 4.3 ml. Die individuellen Mittelwerte sind in Abbildung 4 graphisch dargestellt. Das Volumen schwankte zwischen 21.5 ± 2.9 ml (Hengst E) und 94.2 ± 10.7 ml (Hengst G). Signifikante Unterschiede waren zwischen Hengst G und allen anderen sowie zwischen den Hengsten A und E vorhanden.

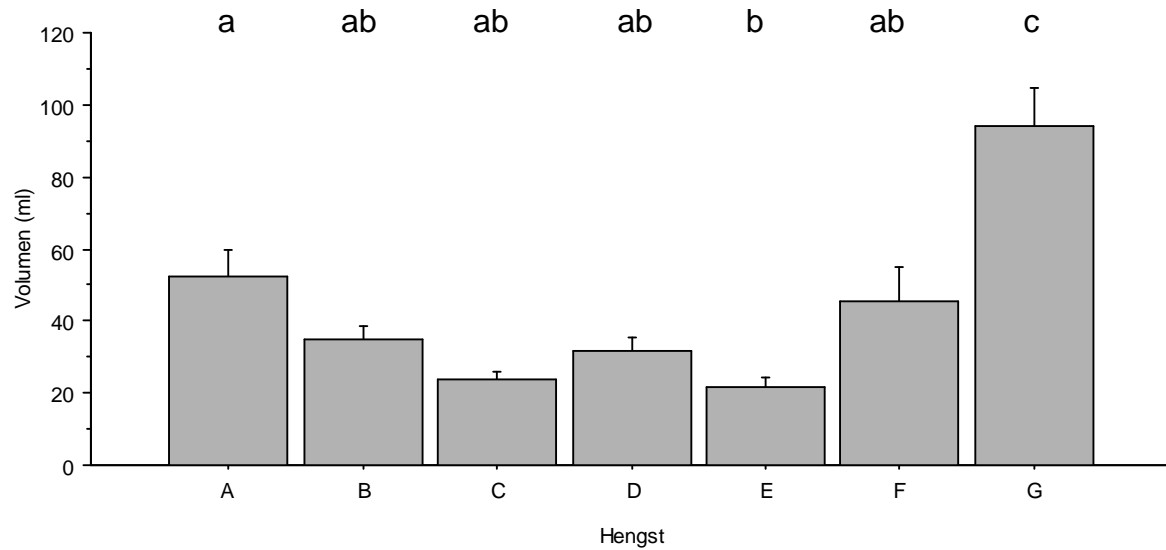


Abbildung 4: Durchschnittliches ($m \pm \text{SEM}$) Volumen von 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten (A-G). Hengste mit unterschiedlichen Indizes^{abc} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

5.1.2 Spermienkonzentration

Die durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) Spermienkonzentration der 7 Hengste betrug 193.0 ± 17.0 Millionen/ml. Die individuellen Mittelwerte sind in Abbildung 5 graphisch dargestellt. Die Spermienkonzentration schwankte zwischen 76.3 ± 9.0 Millionen/ml (Hengst A) und 326.9 ± 42.5 Millionen/ml (Hengst E). Signifikante Unterschiede waren zwischen Hengst A und den Hengsten B, C und E, zwischen Hengst E und den Hengsten F und G sowie zwischen den Hengsten B und G vorhanden.

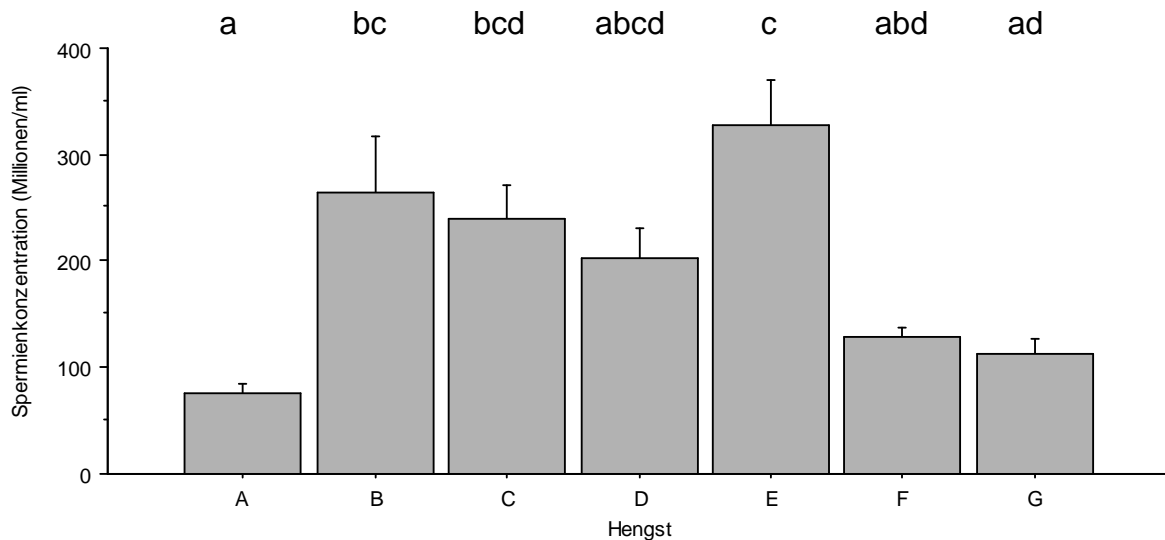


Abbildung 5: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) Spermienkonzentration von 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten (A-G). Hengste mit unterschiedlichen Indizes^{abcd} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

5.1.3 Gesamtspermienzahl

Die durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) Gesamtspermienzahl der 7 Hengste betrug 6679.7 ± 459.7 Millionen. Die individuellen Mittelwerte sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt. Die Gesamtspermienzahl schwankte zwischen 3829.7 ± 513.8 Millionen (Hengst A) und 10221.3 ± 1315.5 Millionen/ml (Hengst G). Signifikante Unterschiede waren zwischen Hengst A und den Hengsten B und G sowie zwischen den Hengsten C und G vorhanden.

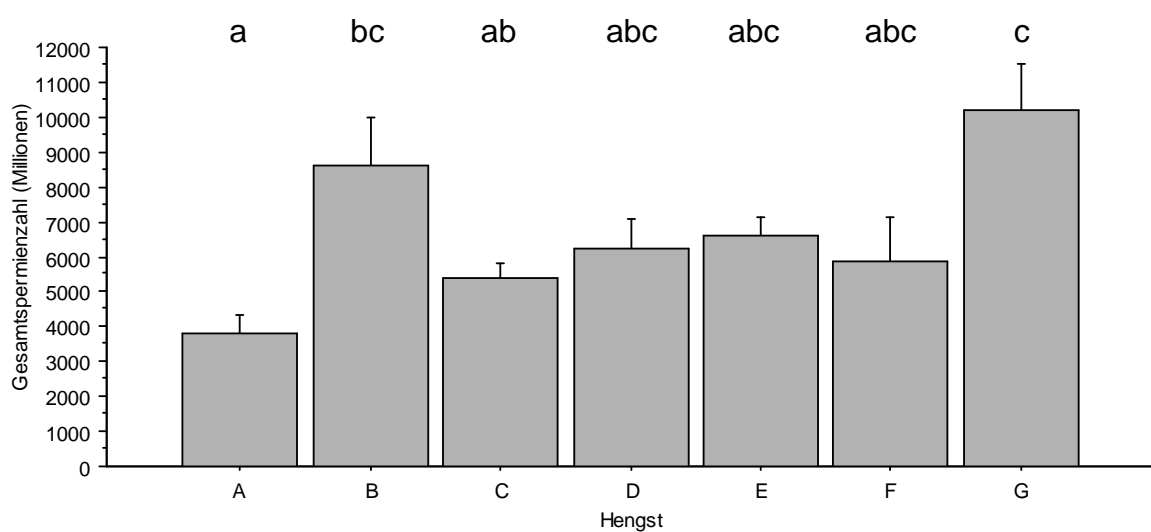


Abbildung 6: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) Gesamtspermienzahl von 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten (A-G). Hengste mit unterschiedlichen Indizes^{abc} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

5.1.4 Totale Motilität

Die durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) totale Motilität der 7 Hengste betrug $73.5 \pm 2.1\%$. Die individuellen Mittelwerte sind in Abbildung 7 graphisch dargestellt. Die totale Motilität schwankte zwischen $49.2 \pm 2.4\%$ (Hengst A) und $86.0 \pm 3.0\%$ (Hengst B). Signifikante Unterschiede waren zwischen Hengst A und allen anderen Hengsten sowie zwischen Hengst E und den Hengsten B und C vorhanden.

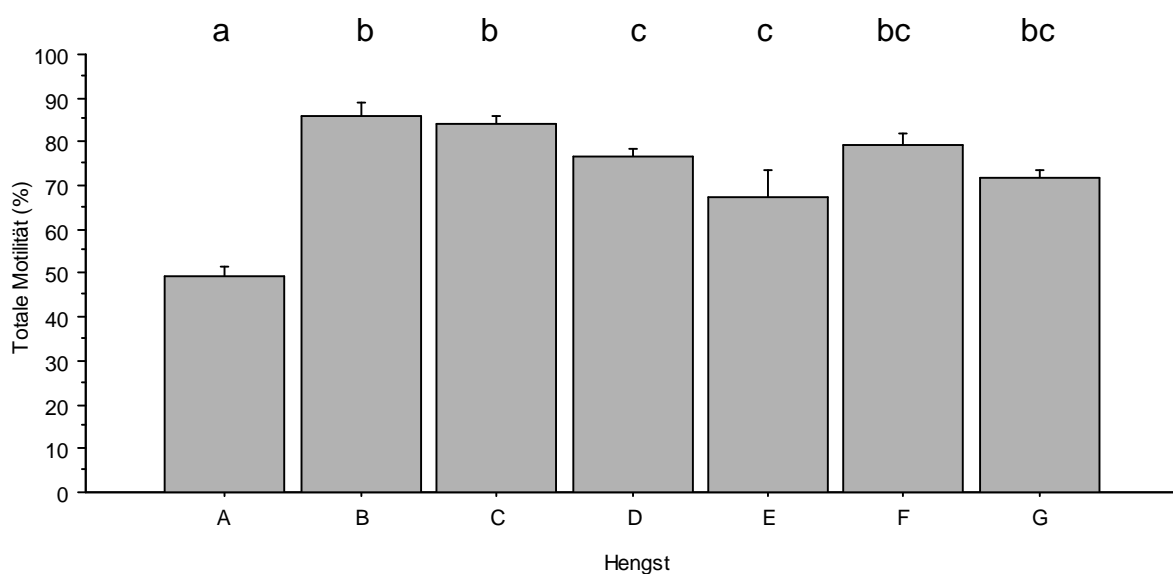


Abbildung 7: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) totale Motilität von 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten (A-G). Hengste mit unterschiedlichen Indizes^{abc} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

5.1.5 Progressive Motilität

Die durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) progressive Motilität der 7 Hengste betrug $48.7 \pm 2.0\%$. Die individuellen Mittelwerte sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt. Die progressive Motilität schwankte zwischen $29.3 \pm 2.5\%$ (Hengst A) und $67.7 \pm 2.2\%$ (Hengst B). Signifikante Unterschiede waren zwischen Hengst A und allen Hengsten ausser Hengst E, zwischen Hengst B und allen Hengsten mit Ausnahme von Hengst C sowie zwischen Hengst E und den Hengsten C und G vorhanden.

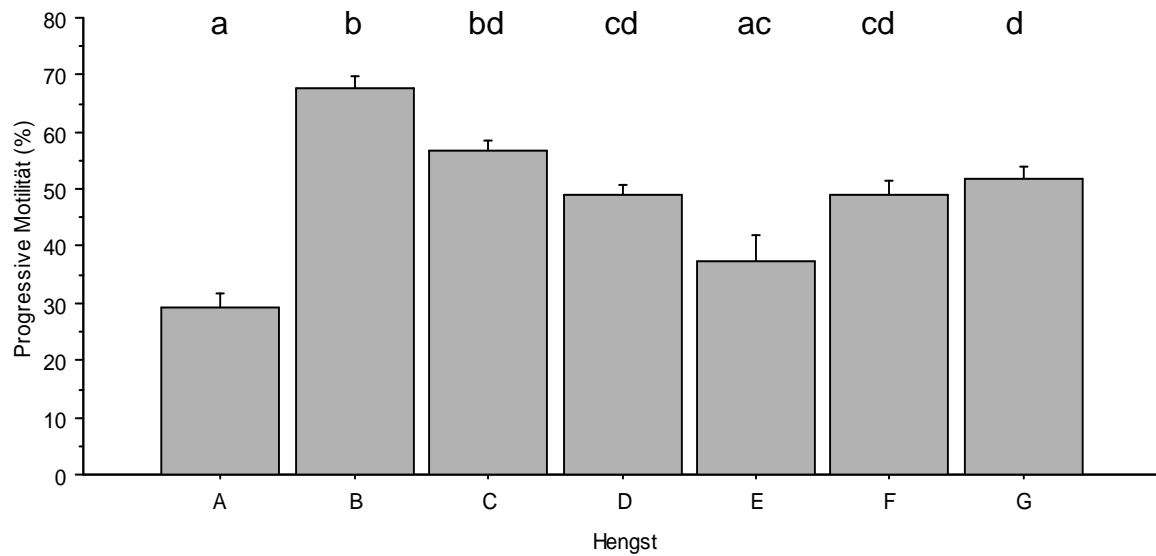


Abbildung 8: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) progressive Motilität von 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten (A-G). Hengste mit unterschiedlichen Indizes^{abcd} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

5.1.6 Rapide Motilität

Die durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) rapide Motilität der 7 Hengste betrug $65.3 \pm 2.0\%$. Die individuellen Mittelwerte sind in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Die progressive Motilität schwankte zwischen $44.2 \pm 2.2\%$ (Hengst A) und $79.3 \pm 2.5\%$ (Hengst B). Signifikante Unterschiede waren zwischen Hengst A und allen Hengsten ausser Hengst E, zwischen Hengst E und allen Hengsten ausser A und D sowie zwischen den Hengsten B und D vorhanden.

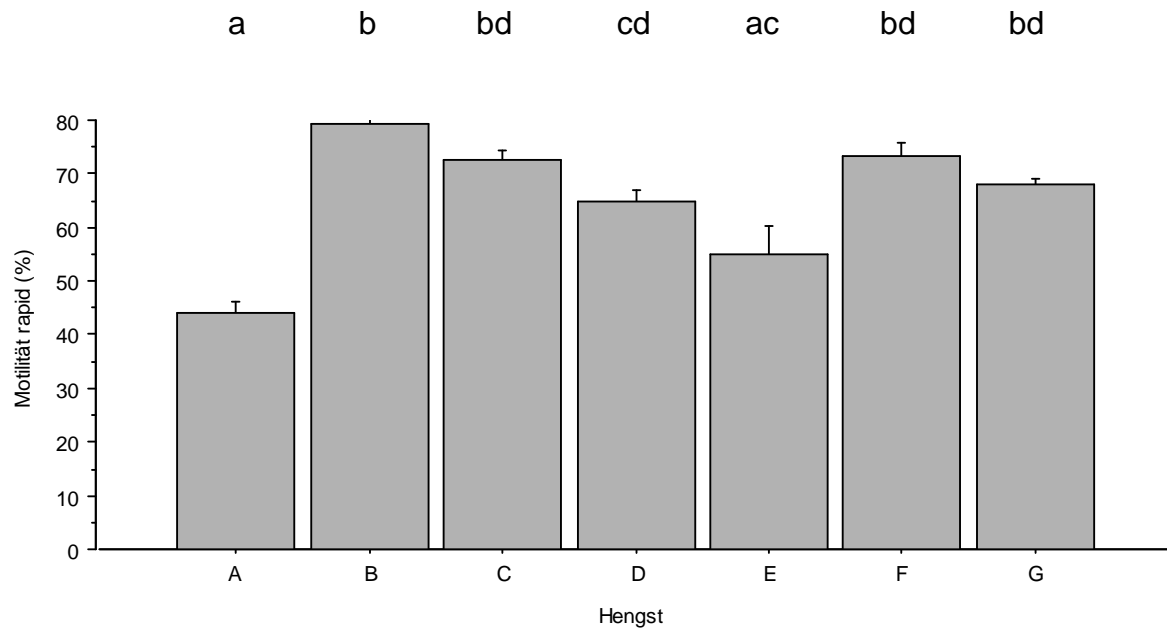


Abbildung 9: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) rapide Motilität von 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten (A-G). Hengste mit unterschiedlichen Indizes^{abcd} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

5.2 Qualität des konservierten Samens

Die Ergebnisse zur Überprüfung des Einflusses von Ejakulat, Verdünner, Zentrifugation und Lagerungszeit sowie die Interaktionen zwischen den verschiedenen Faktoren sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Daraus ist ersichtlich, dass der Verdünner und die Lagerungszeit auf alle Parameter einen signifikanten Einfluss hatten. Das Ejakulat zeigte einen signifikanten Einfluss auf die progressive Motilität und den HOS Test, die Zentrifugation auf den HOS Test und die Vitalität. Eine signifikante Interaktion zwischen Verdünner und Zentrifugation war bei allen Parametern ausser bei der rapiden Motilität feststellbar. Auch signifikant war die Interaktion zwischen Verdünner und Lagerungszeit auf die progressive Motilität und den HOS Test sowie die Interaktion zwischen Verdünner, Lagerungszeit und Zentrifugation auf die progressive Motilität.

Tabelle 3: Einfluss von Ejakulat, Zentrifugation, Verdünner und Lagerungszeit sowie Interaktionen zwischen den einzelnen Faktoren.

Parameter	Totale Motilität P	Progressive Motilität P	Rapide Motilität P	HOS P	Vitalität P
Ejakulat	0.935	0.005*	0.883	0.049*	0.941
Verdünner	0.003*	0.004*	0.002*	<0.001*	0.018*
Zentrifugation	0.814	0.259	0.721	0.003*	0.009*
Lagerungszeit	<0.001*	0.003*	<0.001*	<0.001*	0.001*
Interaktion Zentrifugation/Verdünner	0.016*	0.037*	0.102	0.002*	0.046*
Interaktion Verdünner/Zeit	0.124	0.001*	0.142	0.011*	0.622
Interaktion Zentrifugation/Verdünner/Zeit	0.056	0.029*	0.279	0.298	0.356

*signifikant (P<0.05)

5.2.1 Totale Motilität

Die totale Motilität der Ejakulate unmittelbar nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM jeweils mit und ohne Zentrifugation, sowie nach einer Lagerungszeit von 24 und 48 Std. ist in den Abbildungen 10-12 dargestellt. Unmittelbar nach der Verdünnung (Abb. 10) schwankten die Mittelwerte ($m \pm \text{SEM}$) der totalen Motilität zwischen $57.7 \pm 1.8\%$ (Equi-ProTM zentrifugiert) und $68.0 \pm 2.0\%$ (GENTTM zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM zentrifugiert und allen anderen Methoden ausser INRA 82-Eigelb zentrifugiert vorhanden.

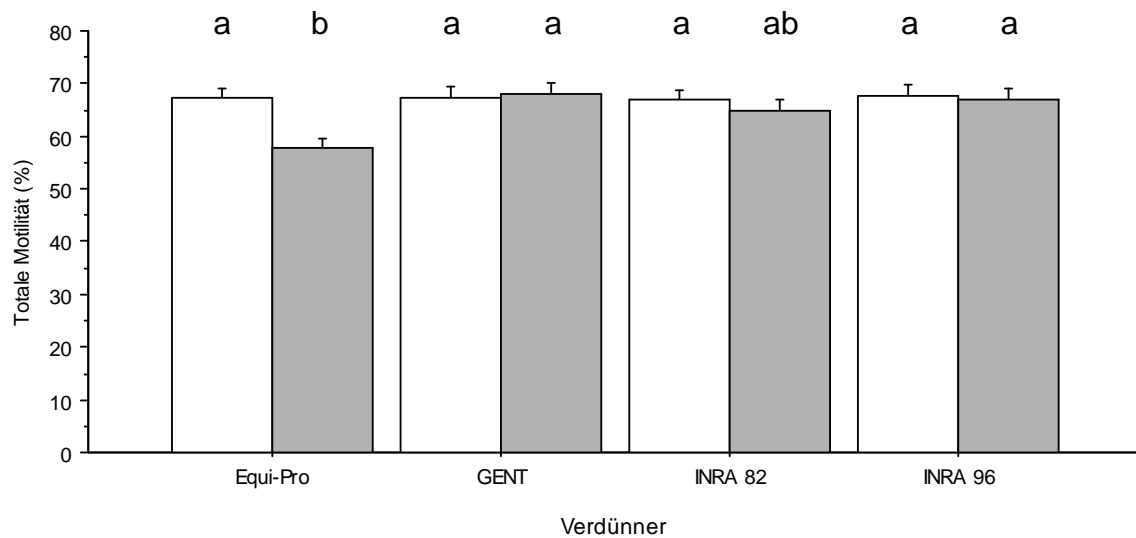


Abbildung 10: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) totale Motilität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten unmittelbar nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{ab} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Nach einer Lagerungszeit von 24 Std. (Abb. 11) schwankte die totale Motilität zwischen $35.3 \pm 3.1\%$ (Equi-ProTM zentrifugiert) und $59.5 \pm 1.9\%$ (GENTTM zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM sowohl zentrifugiert wie auch nicht zentrifugiert und allen anderen Verdünnungsmethoden feststellbar.

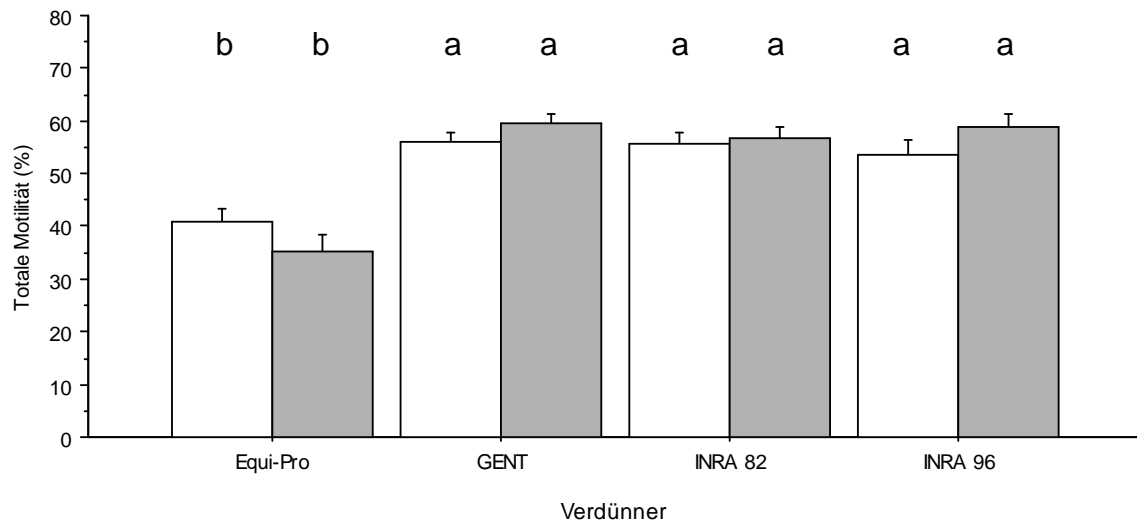


Abbildung 11: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) totale Motilität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten 24 Stunden nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{ab} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Nach einer Lagerungszeit von 48 Std. (Abb. 12) schwankte die totale Motilität zwischen $22 \pm 3.4\%$ (Equi-ProTM zentrifugiert) und $52.8 \pm 2.5\%$ (INRA 96TM zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM zentrifugiert und sämtlichen anderen Verdünnungsmethoden mit Ausnahme von Equi-ProTM nicht zentrifugiert vorhanden. Zudem unterschied sich INRA 96TM zentrifugiert von INRA 96TM nicht zentrifugiert und von Equi-ProTM nicht zentrifugiert.

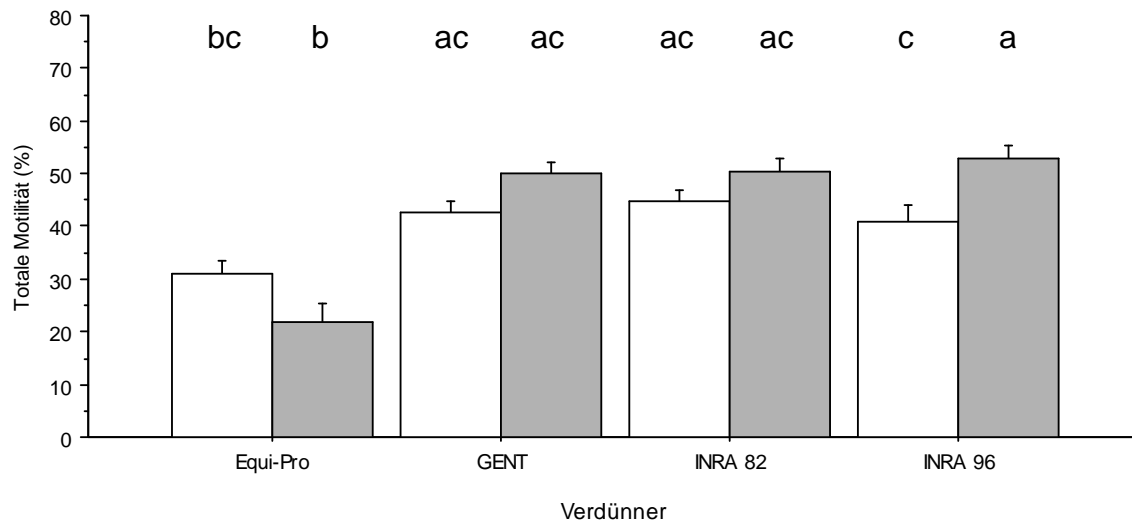


Abbildung 12: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) totale Motilität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten 48 Stunden nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{abc} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

5.2.2 Progressive Motilität

Die progressive Motilität unmittelbar nach Verdünnung der Ejakulate mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM jeweils mit und ohne Zentrifugation, sowie nach einer Lagerungszeit von 24 und 48 Std. ist in den Abbildungen 13-15 dargestellt.

Unmittelbar nach der Verdünnung (Abb. 13) schwankten die Mittelwerte ($m \pm \text{SEM}$) der progressiven Motilität zwischen $32.8 \pm 1.7\%$ (Equi-ProTM zentrifugiert) und $46 \pm 2.1\%$ (INRA 96TM nicht zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM zentrifugiert und beiden Methoden mit GENTTM und INRA 96TM sowie INRA 82-Eigelb nicht zentrifugiert vorhanden.

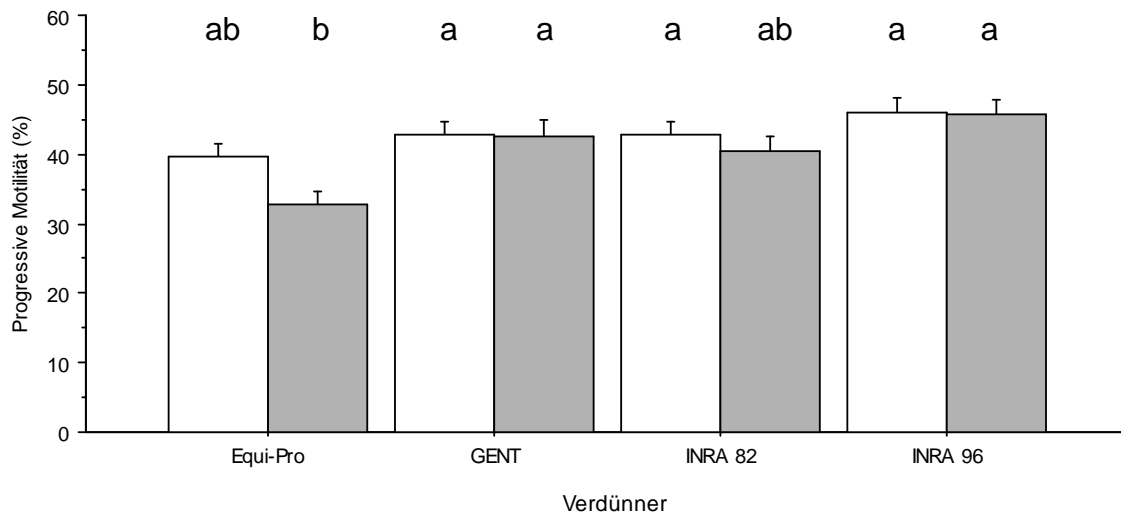


Abbildung 13: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) progressive Motilität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten unmittelbar nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{ab} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Nach einer Lagerungszeit von 24 Std. (Abb. 14) schwankte die progressive Motilität zwischen $20.8 \pm 2.3\%$ (Equi-ProTM zentrifugiert) und $38.1 \pm 1.8\%$ (GENTTM zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen beiden Methoden mit Equi-ProTM und allen anderen Verdünnungsmethoden feststellbar.

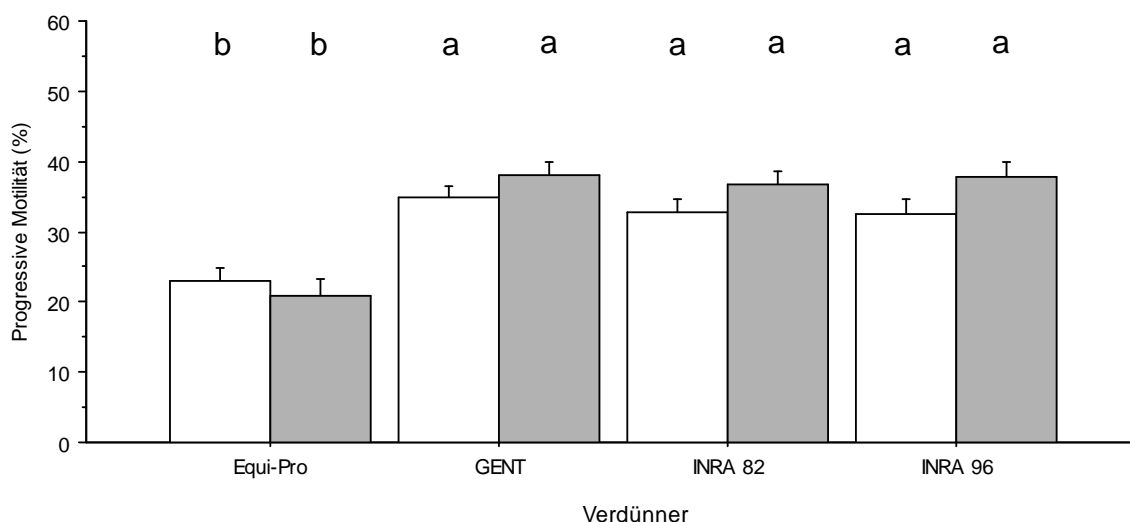


Abbildung 14: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) progressive Motilität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten 24 Stunden nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{ab} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Nach einer Lagerungszeit von 48 Std. (Abb. 15) schwankte die progressive Motilität zwischen $12.2 \pm 2.2\%$ (Equi-ProTM zentrifugiert) und $33.8 \pm 2.1\%$ (INRA 96TM zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM zentrifugiert und allen anderen Verdünnungsmethoden ausser Equi-ProTM nicht zentrifugiert feststellbar. Ausserdem unterschied sich INRA 96TM zentrifugiert signifikant von allen nicht zentrifugierten Verdünnungsmethoden.

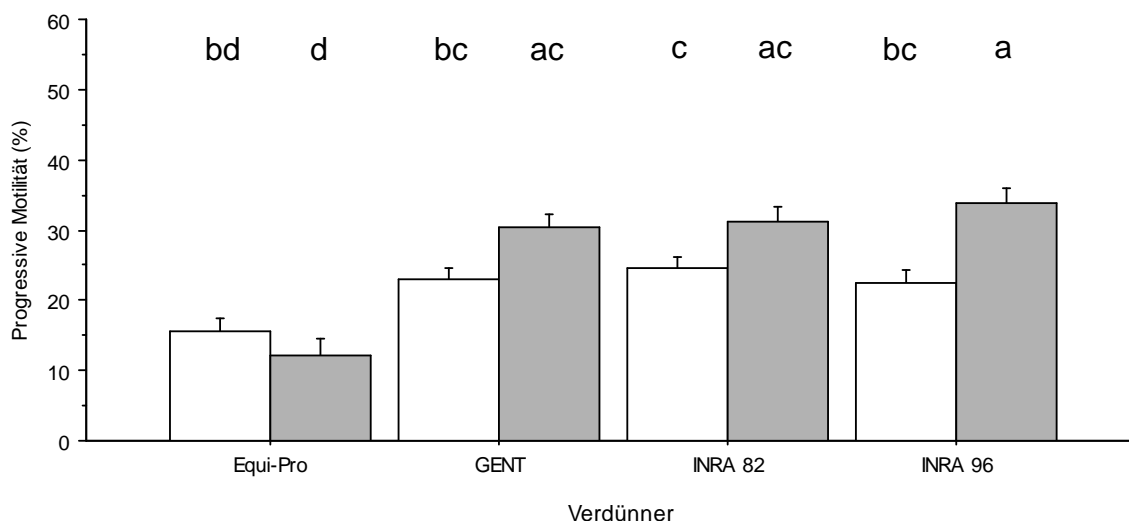


Abbildung 15: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) progressive Motilität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten 48 Stunden nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{abcd} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

5.2.3 Rapide Motilität

Die rapide Motilität unmittelbar nach Verdünnung der Ejakulate mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM jeweils mit und ohne Zentrifugation, sowie nach einer Lagerungszeit von 24 und 48 Std. ist in den Abbildungen 16-18 dargestellt.

Unmittelbar nach der Verdünnung (Abb. 16) schwankten die Mittelwerte ($m \pm \text{SEM}$) der rapiden Motilität zwischen $49.5 \pm 1.9\%$ (Equi-ProTM zentrifugiert) und $61.8 \pm 2.1\%$ (INRA 96TM nicht zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM zentrifugiert und allen anderen Verdünnungsmethoden ausser INRA 82-Eigelb zentrifugiert vorhanden.

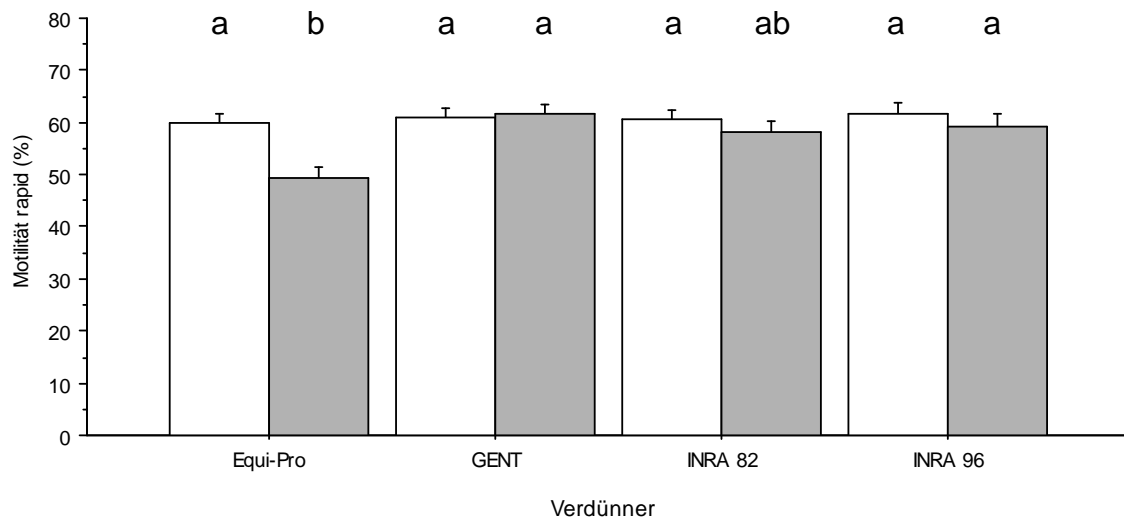


Abbildung 16: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) rapide Motilität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten unmittelbar nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{ab} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Nach einer Lagerungszeit von 24 Std. (Abb. 17) schwankte die rapide Motilität zwischen $29.2 \pm 2.9\%$ (Equi-ProTM zentrifugiert) und $53.2 \pm 1.9\%$ (GENTTM zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM zentrifugiert wie auch nicht zentrifugiert und allen anderen Verdünnungsmethoden feststellbar.

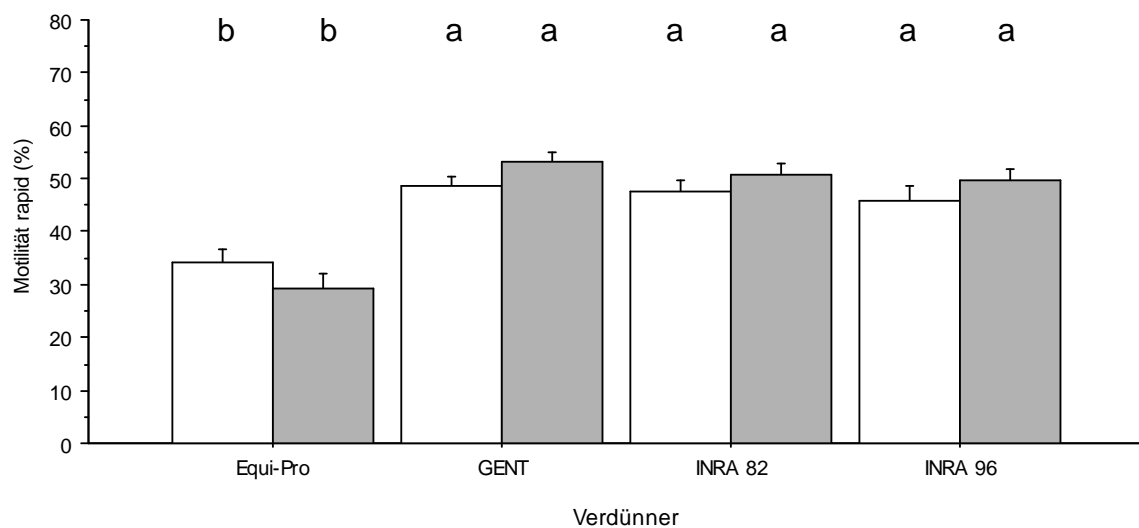


Abbildung 17: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) rapide Motilität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten 24 Std. nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{ab} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Nach einer Lagerungszeit von 48 Std. (Abb. 18) schwankte die rapide Motilität zwischen $17.8 \pm 3.0\%$ (Equi-ProTM zentrifugiert) und $45.6 \pm 2.4\%$ (INRA 96TM zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM zentrifugiert und allen anderen Verdünnungsmethoden ausser Equi-ProTM nicht zentrifugiert vorhanden. Zudem unterschied sich INRA 96TM nicht zentrifugiert signifikant von zentrifugiertem INRA 96TM und INRA 82-Eigelb.

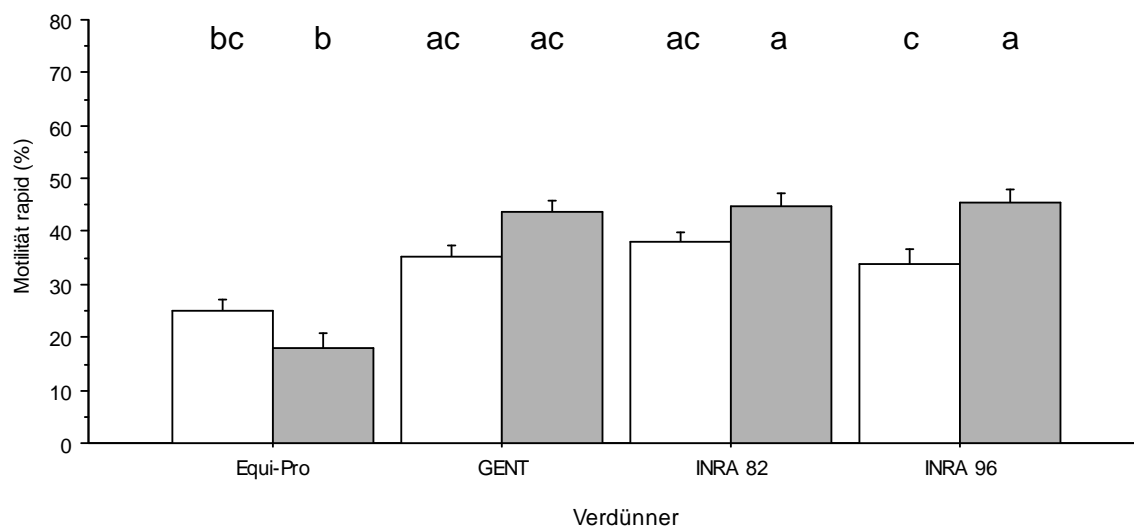


Abbildung 18: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) rapide Motilität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten 48 Stunden nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{abc} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

5.2.4 Vitalität

Die Vitalität unmittelbar nach Verdünnung der Ejakulate mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM jeweils mit und ohne Zentrifugation, sowie nach einer Lagerungszeit von 24 und 48 Std. ist in den Abbildungen 19-21 dargestellt. Unmittelbar nach der Verdünnung (Abb. 19) schwankten die Mittelwerte ($m \pm \text{SEM}$) der Vitalität zwischen $68.9 \pm 2.0\%$ (Equi-ProTM zentrifugiert) und $78.3 \pm 1.7\%$ (INRA 82-Eigelb zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM zentrifugiert und INRA 82-Eigelb zentrifugiert vorhanden.

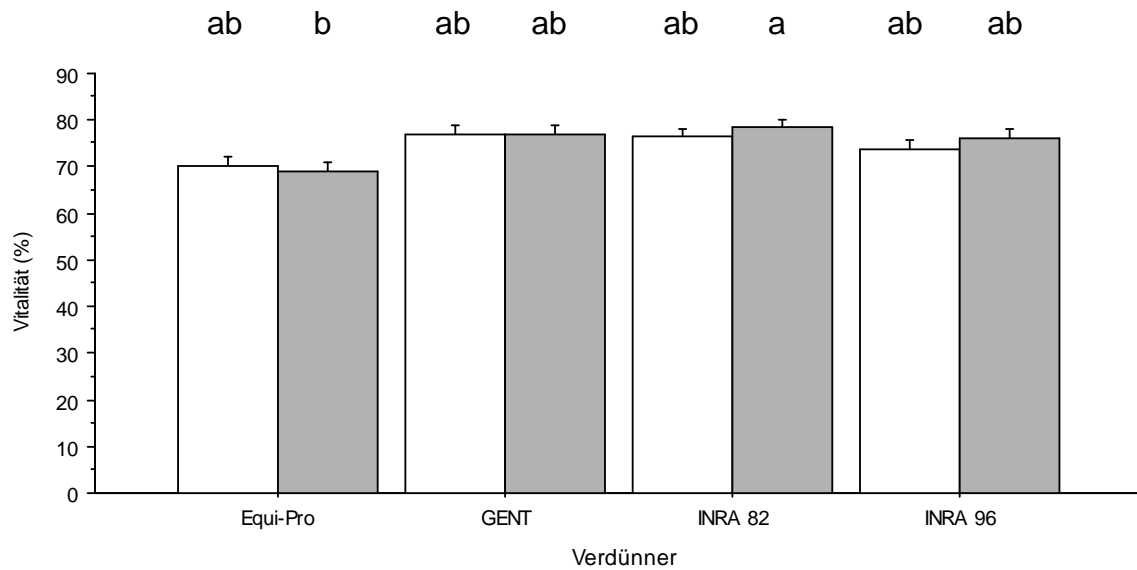


Abbildung 19: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) Vitalität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten unmittelbar nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{ab} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Nach einer Lagerungszeit von 24 Std. (Abb. 20) schwankte die Vitalität zwischen $53.9 \pm 3.0\%$ (Equi-ProTM nicht zentrifugiert) und $72 \pm 1.8\%$ (INRA 82-Eigelb zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM nicht zentrifugiert und allen anderen Verdünnungsmethoden ausser Equi-ProTM zentrifugiert und INRA 96TM nicht zentrifugiert feststellbar. Equi-ProTM zentrifugiert war zudem signifikant unterschiedlich zu GENTTM und INRA 82-Eigelb, beide sowohl zentrifugiert wie auch nicht zentrifugiert.

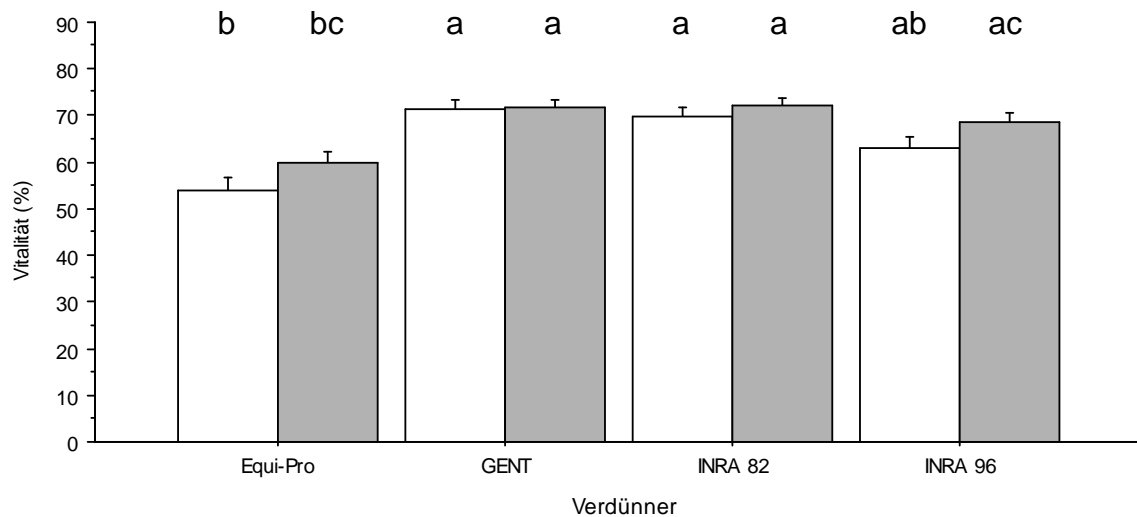


Abbildung 20: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) Vitalität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten 24 Std. nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{abc} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Nach einer Lagerungszeit von 48 Std. (Abb. 21) schwankte die Vitalität zwischen $46.3 \pm 2.8\%$ (Equi-ProTM nicht zentrifugiert) und $65.7 \pm 2.1\%$ (INRA 82-Eigelb nicht zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM nicht zentrifugiert und allen anderen Verdünnungsmethoden ausser Equi-ProTM zentrifugiert und INRA 96TM nicht zentrifugiert vorhanden. Equi-ProTM zentrifugiert unterschied sich signifikant von beiden Methoden mit GENTTM und INRA 82-Eigelb Verdünner.

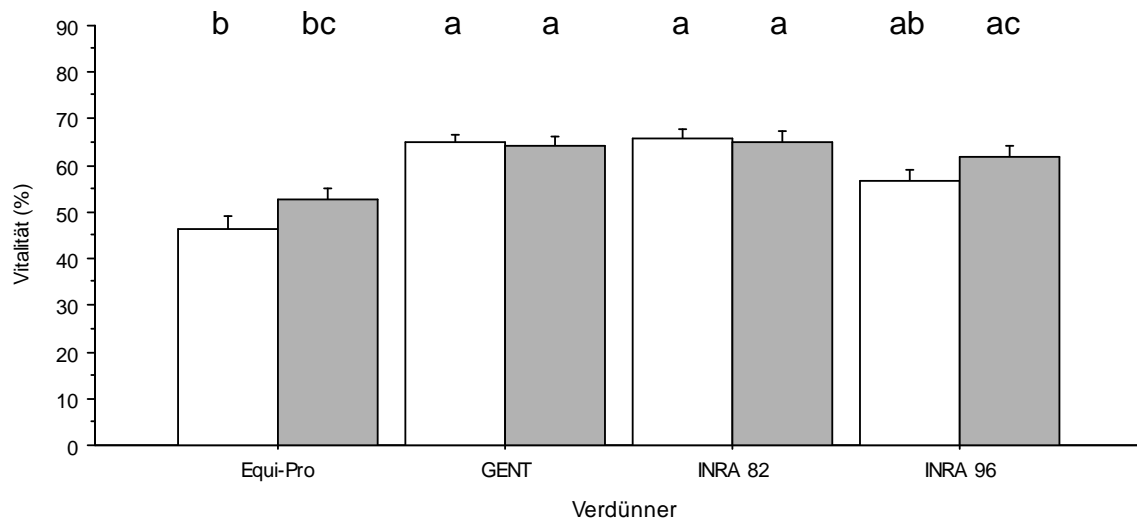


Abbildung 21: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) Vitalität der Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten 48 Stunden nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{abc} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

5.2.5 HOS Test

Die Ergebnisse des HOS Tests unmittelbar nach Verdünnung der Ejakulate mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM jeweils mit und ohne Zentrifugation, sowie nach einer Lagerungszeit von 24 und 48 Std. sind in den Abbildungen 22-24 dargestellt.

Unmittelbar nach der Verdünnung (Abb. 22) schwankten die Mittelwerte ($m \pm \text{SEM}$) der HOS positiven Spermien zwischen $64.5 \pm 1.3\%$ (Equi-ProTM nicht zentrifugiert) und $75.5 \pm 1.3\%$ (GENTTM zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM nicht zentrifugiert und allen Verdünnungsmethoden ausser INRA 96TM nicht zentrifugiert vorhanden. Ausserdem unterschied sich GENTTM zentrifugiert signifikant von INRA 96TM nicht zentrifugiert.

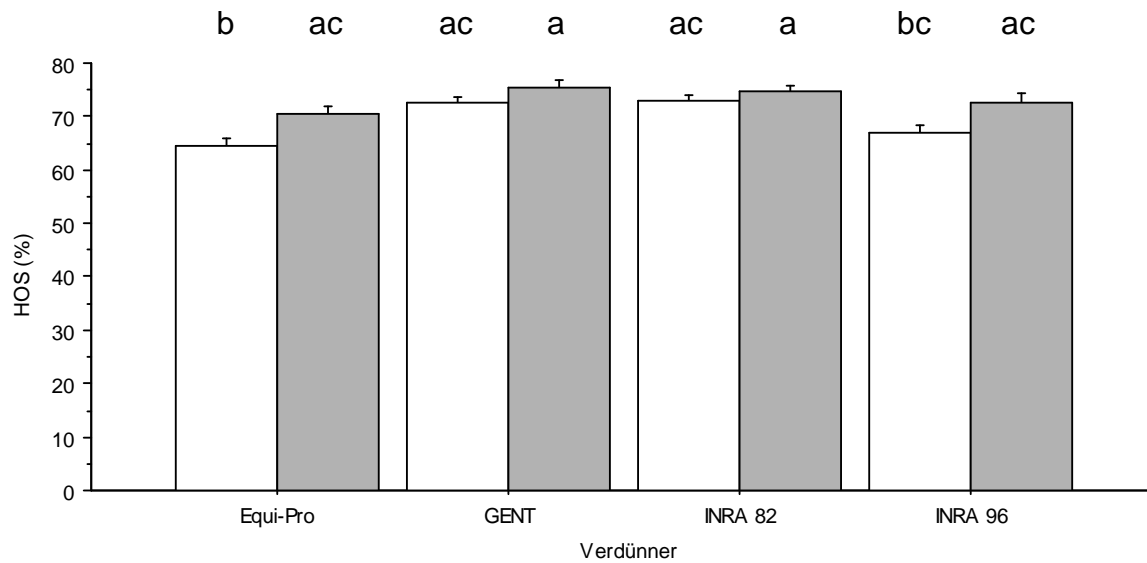


Abbildung 22: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) HOS positive Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten unmittelbar nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{abc} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Nach einer Lagerungszeit von 24 Std. (Abb. 23) schwankte die HOS positiven Spermien zwischen $48.7 \pm 1.2\%$ (Equi-ProTM nicht zentrifugiert) und $71 \pm 0.9\%$ (GENTTM zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen Equi-ProTM nicht zentrifugiert und allen anderen Verdünnungsmethoden ausser INRA 96TM nicht zentrifugiert feststellbar. Equi-ProTM zentrifugiert war ausserdem signifikant unterschiedlich zu allen Verdünnungsmethoden ausser INRA 96TM nicht zentrifugiert.

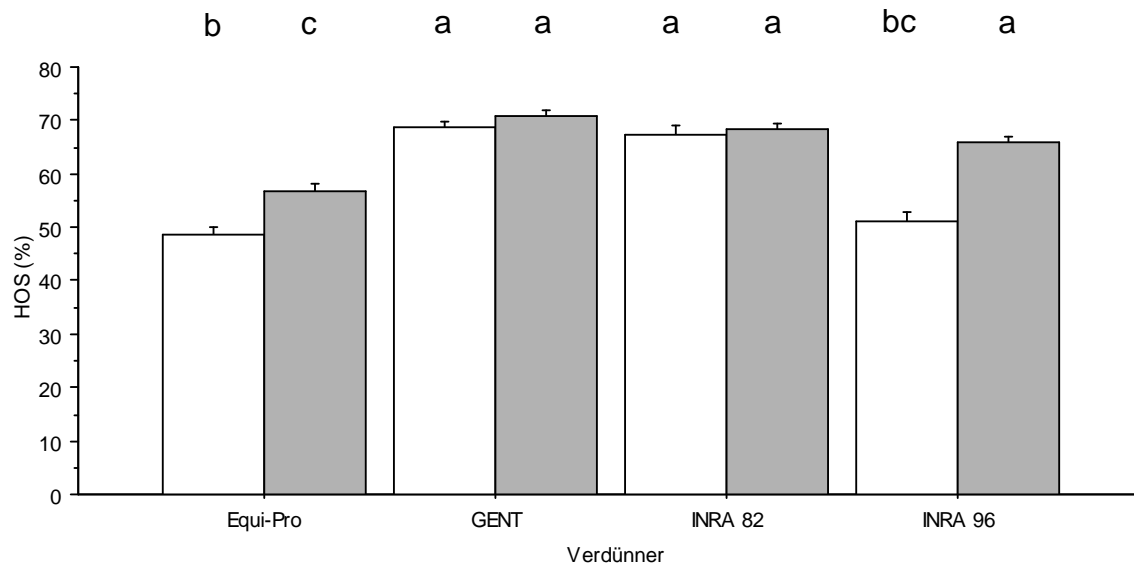


Abbildung 23: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) HOS positive Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten 24 Std. nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{abc} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Nach einer Lagerungszeit von 48 Std. (Abb. 24) schwankte die HOS positiven Spermien zwischen $41.9 \pm 1.9\%$ (INRA 96TM nicht zentrifugiert) und $61.2 \pm 1.3\%$ (GENTTM zentrifugiert). Signifikante Unterschiede waren zwischen INRA 96TM nicht zentrifugiert und allen anderen Verdünnungsmethoden ausser den beiden Methoden mit Equi-ProTM. Equi-ProTM nicht zentrifugiert war signifikant verschieden von beiden Methoden mit INRA 82-Eigelb und GENTTM sowie von INRA 96TM zentrifugiert. Equi-ProTM zentrifugiert war signifikant verschieden von GENTTM und INRA 96TM, beide zentrifugiert sowie von beiden INRA 82-Eigelb Methoden.

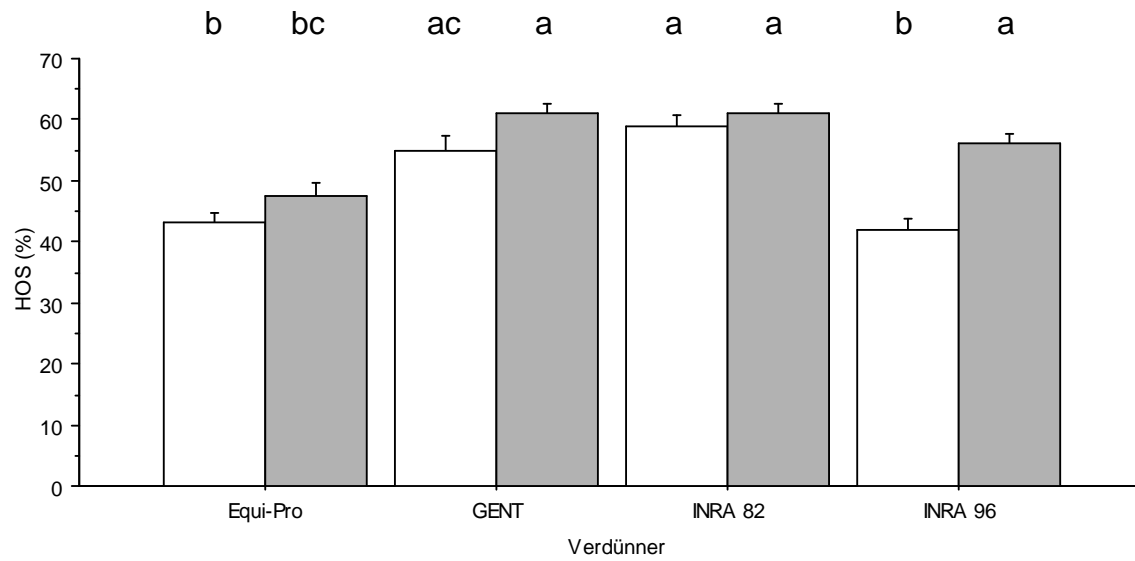


Abbildung 24: Durchschnittliche ($m \pm \text{SEM}$) HOS positive Spermien von je 6 Ejakulaten bei 7 Isländer Hengsten 48 Stunden nach Verdünnung mit Equi-ProTM, GENTTM, INRA 82-Eigelb und INRA 96TM ohne (□) und mit (■) Zentrifugation. Balken mit unterschiedlichen Indizes^{abc} sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

6 Diskussion

Untersuchungen zur Qualität und Konservierung von Samen bei Isländer Hengsten sind in der Literatur nicht vorhanden. Anhand der vorliegenden Studie, die mit 7 Hengsten und je 6 Ejakulaten durchgeführt wurde, konnten wir erstmals die Qualität von Frisch- und Kühltaschen beim Isländer dokumentieren. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen im Frischsamen zeigen, dass der Hengst auf alle untersuchten Parameter einen signifikanten Einfluss hatte. Grosse individuelle Unterschiede in der Samenqualität kommen aber nicht nur beim Isländer vor, sondern konnten auch bei anderen Pferderassen, wie dem Freiburger (Janett et al., 2003a) und dem Warmblut (Janett et al., 2003b) gezeigt werden. Bei den Isländer Hengsten betrugen die Durchschnittswerte für das Ejakulatvolumen, die Spermiedichte, die Gesamtspermienzahl und die Spermienmotilität jeweils 43.4 ml, 193.0 Millionen/ml, 6.7 Milliarden bzw. 73.5%. Die schlechteste Samenqualität wies der mit 19 Jahren älteste Hengst (A) mit einer mittleren Gesamtspermienzahl von 3.8 Milliarden und einer durchschnittlichen Spermienmotilität von 49.2% auf. Als Ursache für die reduzierte Samenqualität konnten bei diesem Hengst eine Asymmetrie sowie eine reduzierte Konsistenz der Hoden und damit Anzeichen einer Hodendegeneration diagnostiziert werden. Ein Vergleich der Samenqualität mit anderen Pferderassen zeigt, dass die einzelnen Samenqualitätsparameter beim Isländer ähnlich sind. In einer Studie (Dowsett und Knott, 1996) mit 168 Hengsten von 9 verschiedenen Rassen betrugen die Mittelwerte für Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl und Spermienmotilität 33.7 ml, 164.1 Millionen/ml, 6.3 Milliarden sowie 76.4%. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen nur bedingt miteinander verglichen werden können, da bekannt ist, dass neben Alter (Dowsett und Knott, 1996) und Rasse (Colenbrander et al., 1992; Dowsett und Knott, 1996) auch die Saison der Samengewinnung (Pikett et al., 1976; Magistrini et al., 1987; Jasko et al., 1991b; Janett et al., 2003a, 2003b) und die Dauer der sexuellen Karenz (Pickett et al., 1975b; Magistrini et al., 1987; Jasko et al., 1991b; Sieme et al., 2002; Janett et al., 2003a, 2003b) die Samenqualität beeinflussen können.

Zur Überprüfung der Eignung der Isländer Hengste für die Kühltaschenproduktion wurden die Ejakulate mit vier verschiedenen Verdünnern jeweils mit und ohne Entfernung des Seminalplasmas durch Zentrifugation verarbeitet und die Samenqualität nach einer Lagerungszeit von 0, 24 und 48 Std. beurteilt. Dabei zeigte sich, dass alle

Samenqualitätsparameter signifikant von der Lagerungszeit und dem Verdünner beeinflusst wurden und eine signifikante Interaktion von Verdünner und Zentrifugation bei allen Parametern ausser der rapiden Motilität vorhanden war. Nach einer Lagerungszeit von 24 Std. fiel die Motilität des mit INRA 82-Eigelb, INRA 96TM und GENTTM verdünnten Samens um rund 10% ab, während mit Equi-ProTM ein deutlich stärkerer Abfall von 20-30% vorhanden war. Nach einer Lagerungszeit von 48 Std. waren die Unterschiede zwischen Equi-ProTM und den anderen Verdünnern noch deutlicher ausgeprägt, wobei bei letzteren nach Zentrifugation bessere Motilitätswerte vorhanden waren. Auch bei der Vitalität und dem Anteil an HOS-positiven Spermien schnitt Equi-ProTM generell schlechter ab als alle anderen Verdüner und die Zentrifugation hatte keinen oder nur einen leicht positiven Effekt auf die gemessenen Werte. Bei Equi-ProTM handelte es sich gemäss Hersteller (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) um eine Modifikation des bewährten Kenney Magermilch-Glucose-Verdüners. Es ist deshalb schwierig zu erklären, warum Equi-ProTM beim Isländer deutlich schlechtere Ergebnisse zeigte als die übrigen in unserer Studie verwendeten Verdüner. In der Zwischenzeit wurde die Zusammensetzung von Equi-ProTM geändert und der Verdünner soll, ähnlich wie INRA 96TM, spezifisch verarbeitete Caseinate enthalten. Vergleichende Untersuchungen der neuen Rezeptur mit bewährten Hengstsamenverdünnern liegen jedoch noch nicht vor.

Neben der Zusammensetzung des Verdüners ist auch der Anteil an Seminalplasma ein wichtiger Faktor für die Qualität von Kühlen. Ein hoher wie auch ein geringer Gehalt an Seminalplasma beeinträchtigen die Motilität von Kühlen und ein Anteil von 5-20% wird für die Produktion von Kühlen generell empfohlen (Jasko et al., 1991c, 1992). Die Ejakulate der Isländer wurden auf 30 Millionen Spermien/ml und mindestens in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt. Der Anteil an Seminalplasma im nicht zentrifugierten Kühlen betrug daher je nach Dichte der Ejakulate zwischen 6 und 50%. Die, vor allem nach einer Lagerungszeit von 48 Std., vorhandenen Unterschiede in der Motilität zwischen zentrifugiertem und nicht zentrifugiertem Samen lassen sich durch den zum Teil hohen Anteil an Seminalplasma erklären. Dabei hatte die Zentrifugation mit INRA 82-Eigelb, INRA 96TM und GENTTM einen positiven mit Equi-ProTM jedoch einen negativen Effekt auf die Motilität. Über unterschiedliche Auswirkungen der Zentrifugation in Abhängigkeit vom verwendeten Verdünner berichten auch früherer Studien (Padilla und Foote, 1991; Love et

al., 2002) die mit original Kenney-Verdünnern negative und mit modifiziertem (Tyrode-Medium) Kenney-Verdünnern positive Auswirkungen auf die Motilität fanden. Dabei gilt zu berücksichtigen, dass mit der Entfernung des Seminalplasmas einerseits schädliche Bestandteile verdünnt, andererseits aber auch das Gleichgewicht wichtiger Elektrolyte wie Na und K gestört wird. Dies ist besonders problematisch bei Verdünnern die vorwiegend aus natürlichen Bestandteilen wie Magermilch bestehen und eine nicht genau bekannte und kontrollierbare Zusammensetzung haben (Padilla und Foote, 1991). Ein hoher Anteil an Seminalplasma kann neben der Beeinträchtigung der Motilität auch die DNA-Integrität der Spermien schädigen (Love et al., 2002). Für einen optimalen Schutz der Spermien im Kühlen wird daher empfohlen, das gesamte Seminalplasma durch Zentrifugation zu entfernen und für die Resuspension einen geeigneten Verdünner mit chemisch definierter Zusammensetzung zu verwenden (Love et al., 2002).

In unseren Untersuchungen war Eigelb Bestandteil der Verdünnern INRA 82-Eigelb und GENTTM. Beide Verdünnern zeigten ähnlich gute Konservierungseigenschaften, wobei die Qualität des Kühlen nach einer Lagerungszeit von 48 Std. mit Zentrifugation leicht besser war als ohne Entfernung des Seminalplasmas. Ein positiver Effekt von Eigelb auf die Spermienmotilität von Kühlen wurde bereits in früheren Studien sowohl mit (Jasko et al., 1991c; Bedford et al., 1995) wie auch ohne (Rota et al., 2004) Zentrifugation des Samens nachgewiesen. Die Kombination von hohen Eigelb- und Seminalplasmakonzentrationen beeinträchtigt jedoch die Spermienmotilität und bei Verwendung von Verdünnern mit mehr als 2% Eigelb sollte daher das Seminalplasma vor der Konservierung durch Zentrifugation unbedingt entfernt werden (Bedford et al., 1995). Bei den von uns verwendeten Verdünnern war bei GENTTM der Eigelbgehalt nicht bekannt und bei INRA 82 betrug dieser 2%. Trotz des geringen Eigelbgehaltes von INRA 82 war jedoch die Samenqualität nach 48 Std. Lagerung mit besser als ohne Zentrifugation.

INRA 96TM war in unserer Studie das einzige Medium mit chemisch genau definierter Zusammensetzung. Dieser Verdünner enthält Hank's Salze, Glucose, Lactose sowie natives Phosphocaseinat und wurde für die Lagerung bei 15°C unter aeroben Bedingungen entwickelt (Batellier et al., 1997, 1998). Bei der von uns vorgegebenen anaeroben Lagerung bei 5°C erzielte INRA 96TM nach 48 Std. mit Zentrifugation im Vergleich zu den übrigen getesteten Verdünnern die beste Motilität. Ohne Zentrifugation waren die Werte jedoch

signifikant tiefer und damit eine schädliche Wirkung des Seminalplasmas bei INRA 96TM eindeutig nachweisbar. Die Überlegenheit von INRA 96TM mit Zentrifugation für die Lagerung von Kühlen während 48 und 72 Std. konnte auch im Vergleich zum Kenney Verdüner und VMD-ZTM (V.M.D., Adrenok, BE) gezeigt werden (Webb und Humes, 2006). Zudem fanden Batellier et al., (2001) eine besser Motilität und Fruchtbarkeit pro Zyklus nach Lagerung des Kühlen während 24 Std. mit INRA 96TM als mit dem Magermilchverdünner *E-Z Mixin*TM. Als Grund für die guten Ergebnisse mit INRA 96TM werden die antioxidativen Eigenschaften vom nativen Phosphocaseinat und dem damit verbunden Schutz der Spermienmembranen angenommen (Batellier et al., 2001; Pillet et al., 2008).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Qualität des Frischsamens beim Isländer vergleichbar ist mit derjenigen anderer Pferderassen und somit eine Kühlenkonservierung grundsätzlich möglich ist. Von den untersuchten Verdünnern INRA 82-Eigelb, INRA 96TM, GENTTM und Equi-ProTM eigneten sich alle ausser Equi-ProTM sehr gut für die Kühlenproduktion. Für eine Lagerung während mehr als 24 Std. war die Zentrifugation mit Entfernung des Seminalplasmas von Vorteil.

7 Literatur

Aitken R J, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41: 183-187.

Amann RP, Pickett BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci* 1987; 7: 145-173.

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000; 21: 1-7.

Batellier F, Magistrini M, Fauquant J, Palmer E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology* 1997; 48: 391-410.

Batellier F, Duchamp G, Vidament M, Arnaud G, Palmer E, Magistrini M. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 degrees C under aerobic conditions. *Theriogenology* 1998; 50: 229-236.

Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvonund JM, Magistrini M. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 2001; 68: 181-190.

Bedford SJ, Graham JK, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5°C with and without seminal plasma. *Theriogenology* 1995; 43: 939-953.

Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 2000; 54: 129-136.

Colenbrander B, Puyk H, Zandee AR, Parlevliet J. Evaluation of the stallion for breeding. *Acta Vet Scand Suppl* 1992; 88: 29-37.

Douglas-Hamilton DH, Osol R, Osol G. A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology* 1984; 22: 291-303.

Dowsett KF, Knott LM. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 1996; 46: 397-412.

Dyrmundsson OR. Reproduction of Icelandic horses with special reference to seasonal sexual activity. *Icelandic Agric Sci* 1994; 8: 51-57.

- Franel AT, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20°C. *Theriogenology* 1987; 27: 517-525.
- Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl* 1994; 15: 620-629.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 3-22.
- Householder DD, Pickett BW, Voss JL, Olar TT. Effect of extender, number of spermatozoa and HCG on equine fertility. *J Eq Vet Sci* 1981; 1: 9-13.
- Hugason DR, Arnason Th, Jonmundsson JV. A note on the fertility and some demographical parameters of Icelandic toelter horses. *Livest Prod Sci* 1985; 12: 161-167.
- Hugason K. Breeding of Icelandic toelter horses: an overview. *Livest Prod Sci* 1994; 40: 21-29.
- Isenbügel E. Das Isländische Pony. Dissertation Universität Zürich, 1966.
- Janett F, Thun R, Bettschen S, Burger D, Hässig M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. *Anim Reprod Sci.* 2003a; 77: 213-221.
- Janett F, Thun R, Niederer K, Burger D, Hässig M. Seasonal changes of semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 2003b; 60: 453-461.
- Jasko DJ, Moran DM, Farlin ME, Squires EL. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology* 1991a; 35: 1059-1067.
- Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion. *Theriogenology* 1991b; 35: 317-327.
- Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1991c; 37: 1241-1252.
- Jasko DJ, Moran DM, Farlin ME, Squires EL, Amann RP, Pickett BW. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. *Proc 38th Ann Conv Am Assoc Equine Pract*, Orlando, Florida; 1992: 649-660.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 219-228.

Katila T. Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology* 1997; 48: 1217-1227.

Kenney RM, Bergmann RV, Cooper WL, Morse GW. Minimal contamination technique for breeding mares: Technique and preliminary findings. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1975; 21: 327-336.

Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology* 1994; 41: 629-636.

Loomis P. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. *Proc 38th Ann Conv Am Ass Equine Pract* 1992; 629-647.

Love CC, Thompson JA, Brinkso SP, Rigby SL, Blanchard TL, Varner DD. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* 2002; 58: 221-224.

Magistrini M, Chanteloube PH, Palmer E. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J Reprod Fertil* 1987; 35: 127-133.

Malmgren L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. *Theriogenology* 1998; 50: 833-839.

Moore AI, Squires EL, Graham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 63: 2372-2381.

Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP. Determination of temperature and cool rate induced cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1992; 38: 999-1012.

Morel DMCG, Gunnarsson V. A survey of the fertility of Icelandic stallions. *Anim Reprod Sci* 2000; 64, 49-64.

Neild DM, Chaves MG, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51: 721-727.

Padilla AW, Foote RH. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *J Anim Sci* 1991; 69: 3308-3313.

Palmer E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. Proc 10th Int Cong Anim Reprod and AI, Urbana-Champaign, IL USA 1984; 3: 377.

Pickett BW, Sullivan JJ, Byers WW, Pace MM, Remmenga EE. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. Fertil Steril 1975a; 26: 167-174.

Pickett BW, Sullivan JJ, Seidel GE. Reproductive physiology of the stallion. V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. J Anim Sci 1975b; 40: 917-922.

Pickett BW, Faulkner LC, Seidel GE, Berndtson WE, Voss JL. Reproductive physiology of the stallion. VI. Seminal and behavioral characteristics. J Anim Sci 1976; 43: 617-625.

Pillet E, Batellier F, Duchamp G, Furstoss V, Le Vern Y, Kerboeuf D, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. High fertility rates with stallion sperm cryopreserved in INRA96®-based extender were not predicted by in vitro parameters. Anim Reprod Sci. 2008; 107: 339-340.

Province CA, Squires EL, Pickett BW, Amann RP. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. Theriogenology 1985; 23: 925-933.

Pruitt JA, Arns MJ, Pool KC. Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following in vitro culture (37°C) and cold-storage (5°C). Theriogenology 1993; 39: 291.

Quinn PJ, Chow PYW, White IG. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. J Reprod Fertil 1980; 60: 403-407.

Samper JC, Morris CA. Current methods for stallion semen cryopreservation: A survey. Theriogenology 1998; 49: 895-903.

Samper JC. Artificial Insemination. In: Samper JC, editor. Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. p. 109-131.

Shekarriz M, De Wire DM, Thomas JrA.J, Agarwal A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. Europ Urol 1995; 28: 31-35.

Sieme H, Echte A, Klug E. Effect of frequency and interval of semen collection on seminal parameters and fertility of stallions. Theriogenology 2002; 52: 313-316.

Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci* 2008; 107: 276-292.

Steinbjörnsson B, Kristjánsson H. Sexual behaviour and fertility in Icelandhorse herds. *Pferdeheilkunde* 1999; 15: 481-490.

Squires EL, Amann RP, McKinnon AO, Pickett BW. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5 or 20°C. *Proc 11th Int Congr Anim Reprod* 1988; 3: 297-299.

Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* 1987; 28: 709-723.

Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* 1988; 29: 1043-1054.

Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Meyers PJ, Meyers SA. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology* 1989; 32: 515-525.

Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 1997; 48: 907–917.

Vidament M, Yvon JM, Couty I, Arnaud G, Nguekam-Feugang J, Noue P, Cotttron S, Le Tellier A, Noel F, Palmer E, Magistrini M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Anim Reprod Sci* 2001; 68: 201–218.

Vidament M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 2005; 89: 115–136.

Watson PF. The protection of ram and bull spermatozoa by low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage and deep-freezing. *J Thermal Biol* 1976; 1: 137-141.

Watson PF. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clark A, editors. *Effects of low temperature on biological membranes*. London: Academic Press; 1981. p. 189-218.

Watson PF. The causes of the reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 481-492.

Webb GW, Arns MJ, Pool KC. Sperm concentration influences recovery of progressively motile spermatozoa and number of inseminations shipped in conventional containers. *J Equine Vet Sci* 1993; 13: 486-489.

Webb G, Humes R. A comparison of the ability of three commercial available diluents to maintain the motility of cold-stored stallion semen. *Anim Reprod Sci* 2006; 94: 135-137.

Weiss S, Janett F, Burger D, Hässig M, Thun R. Einfluss der Zentrifugationsmethode auf Qualität und Kryokonservierung von Hengstsamen. *Schweiz Arch Tierheilk* 2004; 146: 285-293.

Zidane N, Vaillancourt D, Guay P, Poitras P, Bigras-Poulin M. Fertility of fresh equine semen preserved for up to 48 hours. *J Reprod Fertil* 1991; Suppl 44: 644.

8 Dank

An dieser Stelle möchte ich allen, die bei meiner Doktorarbeit mitgeholfen haben, ganz herzlich danken, insbesondere:

Herrn PD Dr. F. Janett, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die wissenschaftliche Betreuung sowie die Übernahme des Referates.

Herrn PD Dr. Colin Schwarzwald, Departement für Pferde, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. R. Thun, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Universität Zürich, für die fachliche Unterstützung sowie die Hilfe bei der Niederschrift.

Herrn Prof. Dr. M. Hässig, Departement für Nutztiere, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die statistische Auswertung der Daten.

Herrn S. Keo, Laborant Andrologie Labor, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Universität Zürich, für die Einarbeitung und Hilfe im Labor.

Den Studentinnen und Studenten Birgit Harrer, Andrea Weber und Andreas Tschuor für die vorbildliche Betreuung und Pflege der Isländer Hengste am Alten Strickhof.

Meinen Arbeitskolleginnen und -kollegen an der Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die Unterstützung in der Versuchsphase.

Dem Tierärzte-Team-Uehlinger für das Verständnis und die Reduktion des Arbeitspensums während der Niederschrift der Dissertation.

Meiner Familie, vor allem meiner Mutter Brigitte Sacher und meinem Bruder Martin Sacher, für die moralische Unterstützung.

Lebenslauf

Konrad Sacher, geboren am 1.6.1977 in Zeiningen, Heimatort Zuzgen AG

1984 - 1989	Primarschule in Zeiningen AG
1989 - 1993	Bezirksschule in Möhlin AG
1993 - 1997	Gymnasium in MuttENZ BL
1997	Eidgenössische Maturität, Typus C
1997 - 1998	Studium der Veterinärmedizin, Universität Basel
1998 - 2002	Studium der Veterinärmedizin, Universität Zürich
2002	Staatsexamen an der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Zürich
2002 - 2006	Assistent/Doktorand an der Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich
2007	Aushilfsassistent in verschiedenen Tierarztpraxen
seit Januar 2008	Assistent bei Dr. med. vet. P. Uehlinger, Tierärzte-Team-Uehlinger in Beringen/Thayngen SH

Beringen/Thayngen, 17.1.2011